

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprechts – Karl – Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Elke Schultz

aus: Pirmasens

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Juni 2006

Identifizierung und Charakterisierung einer Protein-Protein- Interaktion beim Morbus Parkinson

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Gissmann

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Dieter Kübler

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lutz Gissmann, Abteilung Genomveränderungen und Carcinogenese am DKFZ Heidelberg, für die Vertretung dieser Arbeit vor der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprechts – Karl – Universität Heidelberg zu vertreten.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Dieter Kübler danke ich seine Bereitschaft sich als Zweitgutachter der Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Bei Herrn Dr. Bernhard Korn möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit am RZPD in Heidelberg durchzuführen, bedanken, ebenso für seine geduldige Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Besonders bedanken möchte ich mich Dr. Jeremy Simpson, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Pepperkok „Membrane traffic in the early secretory pathway“ am EMBL Heidelberg, für die tatkräftige Unterstützung und Hilfestellung bei der Durchführung der Co-Lokalisationsstudien und Immunpräzipitationen.

Danken möchte ich außerdem ganz herzlich Frau Dr. Claudia Langlais für ihre zahlreichen konstruktiven Diskussionen, ständige Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung.

Des weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe des RZPD in Heidelberg für das angenehme Arbeitsklima und für die Hilfsbereitschaft bedanken, die ich im Verlauf der Arbeit sicher von jedem Mitarbeiter in irgendeiner Weise beansprucht und erhalten habe.

Mein spezielles Dankeschön geht an Mark –einfach dafür, dass er für mich da war und ist, und meine Stimmungsschwankungen klaglos ertrug.

Meinem Vater möchte ich von ganz besonderem Herzen danken, für seine liebevolle Unterstützung und sein Zutrauen, das mich immer wieder ermutigt und mir Kraft gegeben hat.

In Gedenken an Waltraud Schultz.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion der proteasomalen Untereinheit alpha4 mit Parkin untersucht.

Frühere Untersuchungen in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen mit einer humanen fötalen cDNA-Hirn-Bibliothek hatten Hinweise auf eine solche Wechselwirkung ergeben.

Um die Bindung zwischen Parkin und der alpha4-Untereinheit zu verifizieren, und um erste Hinweise auf die mögliche Bindungsdomäne in Parkin zu erhalten, wurde ein weiterer Yeast-Two-Hybrid-Assay mit verschiedenen Parkin-Konstrukten, inklusive mutierten Proteinen von Parkin, durchgeführt. Dieser Assay bestätigte die Interaktion zwischen Parkin und alpha4, konnte jedoch keine Hinweise auf die Bindungsdomäne liefern, da sämtliche C-terminalen Konstrukte in einem Vortest (Reporteraktivitätsassay) als autoaktivierend reagierten und somit nicht bei der anschließenden *Interaktions Mapping*-Analyse eingesetzt werden konnten.

Als weitere Bindungsstudien wurden Co-Lokalisationsstudien, Co-Immunpräzipitationen, Pull Down-Experimente und Gelfiltrationen durchgeführt.

Die Ergebnisse der übrigen Versuche ließen folgende Rückschlüsse bezüglich der Interaktion zwischen der alpha4-Untereinheit des 26S Proteasoms und Parkin zu:

Zum einen konnte anhand der Ergebnisse ein Bindungsbereich eingegrenzt werden. Eine Bindung von alpha4 mit dem amino-terminalen Bereich von Parkin (Aminosäuren 1-191) kann ausgeschlossen werden. Dagegen wurde aber immer mit einem der carboxy-terminalen Fragmente von Parkin (Aminosäuren 192-465) eine Interaktion mit der alpha4-Untereinheit nachgewiesen. Dies lässt darauf schließen, dass die Bindungsdomäne in diesem carboxy-terminalen Bereich von Parkin liegt.

Zum anderen zeigten die Ergebnisse, dass weder die Mutation in der Ring 1-Domäne (Mutante C289) noch in der Ring 2-Domäne (Mutante C418R) die Interaktion aufzuheben vermag.

Die Ergebnisse der verschiedenen Experimente für die einzelnen Parkin-Konstrukte waren teilweise unterschiedlich. Daher ist anzunehmen, dass die Interaktion sehr schwach und/oder transient ist.

Die Interaktion von alpha4 mit Parkin ist ein bisher unbekanntes Phänomen, da bisher nur Interaktionen bekannt waren, bei denen Parkin mit Untereinheiten der 19S-Komplexe (Rpn10, Rpt6, Rpn1 oder Rpn2) des 26S Proteasoms interagiert. Die Untereinheit alpha4 gehört aber zu den Untereinheiten des 20S-Kernkomplexes des 26S Proteasoms. Im Unterschied zu den Interaktionen mit Untereinheiten des 19S Komplexes, erfolgt hier die Bindung nicht am N-Terminus von Parkin, sondern an seinem C-Terminus. Zudem ist alpha4 kein Substrat für die Parkin-abhängige Ubiquitylierung. Demzufolge könnten mögliche Funktionen dieser Interaktion Substrat-Präsentation an das 26S Proteasom sein, oder Regulierung der proteasomalen Aktivität.

Summary

In this work the interaction between the proteasomal subunit alpha4 and Parkin was analysed.

Previous analysis in a Yeast-Two-Hybrid Screen with an human fetal cDNA brain library suggested such an interaction.

To verify the interaction between alpha4 and Parkin, and to get first hints on the potential binding region in Parkin, an additional Yeast-Two-Hybrid assay was performed using different Parkin constructs, including mutated proteins of Parkin. The assay indeed approved the interaction between Parkin and the proteasomal subunit alpha4, but did not revealed any hints on the binding domain since all C-terminal constructs of Parkin were shown to be autoactivating in a preceding reporter activity assay. Therefore those C-terminal constructs could not be set in the following interaction mapping analysis.

For other binding studies, co-localisations, co-immunoprecipitations, Pull Down assays and gel filtration were performed.

The results of the other experiments allowed the following conclusions in terms of the interaction between the proteasomal subunit alpha4 and Parkin:

On the basis of these results the position of the binding domain was narrowed down: The binding of alpha4 with the amino-terminal domain of Parkin (amino acids 1-191) was ruled out. In contrast to this, using the carboxy-terminal constructs of Parkin (amino acids 192-465) an interaction with the alpha4 subunit was consistently shown. This led to the conclusion that the binding domain must be located in the carboxy-terminal part of Parkin.

Moreover the results showed that neither the mutation in the domain of ring 1 (mutant C289) nor the mutation in ring 2 domain (mutant C418R) was able to abolish the interaction.

The results of the experiments using the different Parkin constructs varied slightly. Thus it is assumed that the interaction is very weak and/or transient.

So far the interaction of alpha4 with Parkin is a unknown phenomenon, because until now the only interactions known for Parkin are with subunits of the 19S cap complex of the 26S proteasome (Rpn10, Rpt6, Rpn1 or Rpn2). However, the subunit alpha4 belongs to the 20S core complex of the 26S proteasome.

Unlike the interactions with the subunits of the 19S complex, where the binding takes place at the amino-terminus, in the case of the interaction with the alpha4 subunit the binding region is located at the carboxy-terminus of Parkin. Alpha4 is also not a substrate for Parkin-dependent ubiquitylation. Putative functions of the interaction might therefore be substrate presentation to the 26S proteasome or regulation of proteasomal activity.

Inhaltsverzeichnis

1.1.1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	EINLEITUNG	7
2.1	DAS GEHIRN	7
2.2	MORBUS PARKINSON	10
2.2.1	Symptome des Morbus Parkinson	12
2.2.2	Therapie-Methoden	13
2.2.3	Parkinson-Genetik	14
2.2.4	Das Parkin-Gen PARK2	16
2.3	DAS 26S PROTEASOM	18
2.3.1	Modell des Parkin-vermittelten Ubiquitin-26S Proteasom-Proteinabbau-Weges	19
2.4	ZIELSETZUNG	21
3	MATERIAL	22
3.1	GERÄTE	22
3.2	CHEMIKALIEN	23
3.3	ENZYME	26
3.4	ANTIKÖRPER	27
3.5	MOLEKULARBIOLOGISCHE KITSYSTEME	27
3.6	HEFESTÄMME (SACCHAROMYCES CEREVISIAE)	28
3.7	BAKTERIENSTÄMME (ESCHERICHIA COLI)	28
3.8	ZELLEN	29
3.9	AMINOSÄURE-STAMMLÖSUNGEN	29
3.10	ANTIBIOTIKA-STAMMLÖSUNGEN	29
3.11	OLIGONUKLEOTIDE	30
3.12	SOFTWARE	30
3.13	SONSTIGE MATERIALIEN	31
4	METHODEN	32
4.1	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA	32
4.1.1	Minipräparation von Plasmid-DNA mittels „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von QIAGEN	32
4.1.2	Midipräparation von Plasmid-DNA mittels „Plasmid Midi Kit“ von QIAGEN	34
4.1.3	Roboterpräparation von Plasmid-DNA im 96-well-Platten-Maßstab mittels „QIAwell 8 Ultra Plasmid Kit“ von QIAGEN	36
4.2	REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN MITTELS „HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION KIT“ VON ROCHE APPLIED SCIENCE	38
4.3	DNA-QUANTIFIZIERUNG MITTELS ABSORPTIONSSPEKTROMETRIE	39
4.4	RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA	40
4.5	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN MITTELS T4-LIGASE	41
4.6	MUNG BEAN-REAKTION	42
4.7	PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION	43
4.8	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN	44
4.8.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen mittels Kalziumchlorid-Methode	45

4.8.2	<i>Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen nach Angaben von BioRad..</i>	46
4.8.3	<i>Testen der Kompetenz kompetenter Zellen.....</i>	48
4.9	TRANSFORMATION IN KOMPETENTE BAKTERIEN	48
4.9.1	<i>Transformation in chemisch kompetente Bakterien</i>	48
4.9.2	<i>Transformation in elektro-kompetenter Bakterien</i>	49
4.10	GATEWAY™ CLONING TECHNOLOGY	50
4.10.1	<i>GATEWAY™ BP-Reaktion.....</i>	53
4.10.2	<i>GATEWAY™ LR-Reaktion</i>	54
4.11	AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE	55
4.12	DNA-ISOLIERUNG AUS AGAROSEGELEN	57
4.12.1	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus TAE-gepufferten Agarosegelen mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ von QIAGEN.....</i>	57
4.12.2	<i>Isolierung von Plasmid-DNA-Fragmenten aus TAE-gepufferten Low Melting Point-Agarosegelen mittels „GELase™ Agarose Gel-Digesting Preparation Kit“ von EPICENTRE</i>	58
4.13	BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR SYSTEM.....	60
4.13.1	<i>Co-Transfektion von adhärenenten Insektenzellen Spodoptera frugiperda mit LIPOFECTIN® Reagent von Invitrogen</i>	64
4.13.2	<i>Virus-Amplifikation (1.VA und 2.VA) in Sf9-Zellen</i>	65
4.13.3	<i>Protein-Expression (PE) in Sf9-Zellen.....</i>	66
4.14	ANALYTISCHE PRÄPARATION VON BACULO-EXPRIMIERTEN PROTEINEN AUS SF9-ZELLEN ÜBER AFFINITÄTCHROMATOGRAPHIE.....	67
4.14.1	<i>Reinigung von GST-getaggtten Proteinen mittels Batch-Verfahren</i>	70
4.14.2	<i>Reinigung von GST-getaggtten Proteinen mit selbst-gepackten Säulen</i>	72
4.14.3	<i>Bradford-Tüpfeltest</i>	73
4.15	QUANTITATIVE PROTEIN-BESTIMMUNG MITTELS BRADFORD-TEST IM ELISA-READER	74
4.16	DENATURIERENDE SDS-GEL-ELEKTROPHORESE	77
4.17	PROTEIN-FIXIERUNG IM TRIS-HCL-SDS-POLYACRYLAMID-GEL.....	82
4.18	NACHWEISMETHODE FÜR PROTEINE IM POLYACRYLAMID-GEL: COOMASSIE-BLAU-FÄRBUNG	82
4.19	WESTERN BLOT & IMMUNFÄRBUNG	84
4.19.1	<i>Western Wet Blot.....</i>	84
4.19.2	<i>Färbung der transferierten Proteine zur Überprüfung der Blot-Effizienz via Ponceau S-Färbung.....</i>	86
4.19.3	<i>Blocken.....</i>	87
4.19.4	<i>Bindung der Erst- und Zweit-Antikörper & Visualisierung über Chemilumineszenz-Reaktion.....</i>	88
4.20	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (POLYMERASE CHAIN REACTION)	90
4.21	ZELLKULTUR VON SPODOPTERA FRUGIPERDA (SF9)-ZELLEN.....	93
4.21.1	<i>Auftauen von kryo-konservierten Sf9-Zellen</i>	94
4.21.2	<i>(Sub-)Kultivierung von Sf9.....</i>	94
4.21.2.1	<i>Sub-Kultivierung von Sf9-Monolayer-Kulturen</i>	94
4.21.2.2	<i>(Sub-)Kultivierung von Sf9-Suspensionskulturen</i>	95
4.21.3	<i>Vitalfärbung von Zellen mittels Trypanblau & anschließende Zellzahlbestimmung mittels Häemocytometer.....</i>	95
4.22	ZELLKULTUR VON HELa-ZELLEN	96
4.23	TRANSFEKTION VON HELa-ZELLEN MIT DEM „FUGENE 6 TRANSFECTION REAGENT“ VON ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS.....	97
4.24	NACHWEIS VON MYCOPLASMEN MITTELS „VENORGE™ PCR-KIT“ VON MINERVA BIOLABS	98

4.25	IMMUNFLUORESCENZ	100
4.25.1	<i>Zellfixierung mittels Methanol und anschließende Antikörpermarkierung ...</i>	101
4.25.2	<i>Zellfixierung mittels Paraformaldehyd und anschließende Antikörpermarkierung.....</i>	102
4.26	NICHT-DENATURIERENDE CO-IMMUNPRÄZIPITATION	104
4.27	YEAST-TWO-HYBRID-ASSAY	107
4.27.1	<i>Hefe-Co-Transformation</i>	109
4.27.2	<i>Beta-Galactosidase-Test</i>	112
4.28	GELFILTRATION	113
4.29	PULL DOWN	115
5	ERGEBNISSE	117
5.1	VERIFIZIERUNG DER GEFUNDENEN PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTION ÜBER EINEN WEITEREN YEAST-2-HYBRID-ASSAY	117
5.1.1	<i>Die verschiedenen Parkin- und alpha4-Klone für den Yeast-Two-Hybrid-Assay</i>	117
5.1.2	<i>C-terminale Parkin-Konstrukte sind Autoaktivierer.....</i>	120
5.1.3	<i>Parkin interagiert mit dem carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4.....</i>	125
5.2	KLONIERUNG DER PARKIN-KONSTRUKTE UND DES FRAGMENTES DER 26S PROTEASOMALEN UNTEREINHEIT ALPHA4 ÜBER DIE GATEWAY TM CLONING TECHNOLOGY	127
5.2.1	<i>Herstellung der Expressionsvektoren.....</i>	127
5.2.2	<i>Klonierung der Konstrukte in die GATEWAYTM-Expressionsvektoren.....</i>	130
5.2.2.1	<i>Genspezifische PCR.....</i>	131
5.2.2.2	<i>attB-Tail-PCR</i>	133
5.2.2.3	<i>Überprüfung der Eingangsklone in dem Vektor pDONR201</i>	135
5.2.2.4	<i>Überprüfung der Expressionsklonen in den verschiedenen Vektoren</i>	137
5.3	KLONIERUNG DER PARKIN-KONSTRUKTE UND DES FRAGMENTES DER 26S PROTEASOMALEN UNTEREINHEIT ALPHA4 ÜBER DIE KLASSISCHE RESTRIKTIONSKLONIERUNG	143
5.4	EXPRESSION DER BETEILIGTEN PROTEINE IM BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR SYSTEM (BEVS)	146
5.5	NACHWEIS DER INTERAKTION VON PARKIN UND DEM CARBOXY-TERMINALEN FRAGMENT DER PROTEASOMALEN UNTEREINHEIT ALPHA4 ÜBER PULL DOWN- EXPERIMENTE	148
5.5.1	<i>Reinigung von Parkin-GST-Fusionsproteinen für die Pull Down-Experimente.. ..</i>	148
5.5.2	<i>Herstellung des Lysates des His-getaggtten Interaktionspartners, dem carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4.....</i>	151
5.5.3	<i>Wildtyp- und Mutations-Konstrukte interagieren mit dem carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4.....</i>	152
5.6	INTERAKTION VON PARKIN MIT DEM NATÜRLICHEN 26S PROTEASOM VON INSEKTENZELLEN SPODOPTERA FRUGIPERDA Sf9	156
5.6.1	<i>Kalibrierung der Gelfiltrationssäule HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR.....</i>	157
5.6.2	<i>Nachweis der Interaktion von Parkin mit alpha4 über die Methode der Gelfiltration nicht möglich.....</i>	161
5.6.2.1	<i>Gelfiltrationslauf der Co-Expression des Volllängen-Parkin-Wildtyps mit dem carboxy-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4</i>	163

5.6.2.2	Gelfiltrationslauf der Co-Expression des amino-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem carboxy-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4	165
5.6.2.3	Gelfiltrationslauf der Co-Expression des carboxy-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem carboxy-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4	167
5.6.2.4	Gelfiltrationslauf der Co-Expression des Volllängen-Konstruktes der Parkin-Mutante C418R mit dem carboxy-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4	169
5.6.2.5	Gelfiltrationslauf der Co-Expression des carboxy-terminalen Fragmentes der Parkin-Mutante C418R mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4	171
5.7	CO-LOKALISATION VON PARKIN UND ALPHA4 IN HeLa-ZELLEN.....	173
5.7.1	<i>Test auf Löslichkeit der einzeln exprimierten Interaktionspartner Parkin und alpha4 in HeLa-Zellen.....</i>	174
5.7.2	<i>Einfluss der Aggresomen auf die Intermediärfilamente und Lokalisation des Golgi-Apparates</i>	177
5.7.2.1	<i>Einfluss der Aggresomen auf die Verteilung der Intermediärfilamente</i>	177
5.7.2.2	<i>Einfluss der Aggresomen auf die Lage des Golgi-Apparates</i>	180
5.7.3	<i>Interaktion von Parkin mit der 20S Untereinheit alpha4 des in HeLa-Zellen natürlich vorkommenden 26S Proteasoms</i>	183
5.7.4	<i>Co-Lokalisation von Parkin und carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4</i>	188
5.8	CHARAKTERISIERUNG DER PROTEINBINDUNG VON ALPHA4 UND SEINEM INTERAKTIONSPARTNER PARKIN MITTELS CO-IMMUNPRÄZIPITATION	193
6	DISKUSSION	196
6.1	PARKIN INTERAGIERT MIT DER UNTEREINHEIT ALPHA4 DES 26S PROTEASOMS	196
6.1.1	<i>Lokalisation der Bindungsdomäne im C-Terminus von Parkin</i>	196
6.1.1.1	<i>Mutationen im C-Terminus von Parkin heben die Interaktion nicht auf ...</i>	197
6.1.2	<i>Pull Down-Experiment: Lokalisierung der Bindungsdomäne</i>	198
6.2	INTERAKTION VON ALPHA4 UND PARKIN BESITZT SCHWACHEN UND/ODER TRANSIENTEN CHARAKTER	199
6.3	AGGRESOMEN-BILDUNG IN HeLa-ZELLEN NACH PARKIN-TRANSFEKTION	200
6.4	NUKLEÄRE UND CYTOPLASMATISCHE LOKALISATION VON ALPHA4.....	201
6.5	TECHNISCHE ASPEKTE DER GRÖßENAUSSCHLUSS-CHROMATOGRAPHIE VON PARKIN UND ALPHA4.....	202
6.6	PARKIN BINDET AN UNTEREINHEIT DES 20S-KERNKOMPLEXES DES 26S PROTEASOMS	203
6.6.1	<i>Mögliche Funktion der Interaktion von alpha4 mit Parkin</i>	204
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	206
8	TABELLENVERZEICHNIS	209
9	LITERATUR	210
10	ANHANG	223
10.1	PCR-PROGRAMME	223
10.2	VEKTOR-KARTEN.....	224

1.1.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
λ	Wellenlänge
Ω	Ohm (physikalische Einheit für den elektrischen Widerstand)
μF	Mikrofarad (physikalische Einheit für die Kapazität)
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
AcNPV	<i>Autographa californica Nukleäres Polyhedrosisvirus</i>
$^{\circ}\text{C}$	Temperaturangabe in Grad Celcius
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BAC	B acterial A rtificial C hromosome
BCA	Bicinchonin Acid (Bicinchoninsäure)
BGG	Bovine Gamma Globulin (Rindergammaglobulin)
bp	b ase p air (Basenpaar)
BSA	Bovine Serum Albumen (Rinderserumalbumin)
BEVS	B aculovirus E xpression V ector S ystem
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl_2	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA (zu einem RNA-Molekül komplementäre DNA)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-Chlorid
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	D eoxyribonucleic A cid (Desoxyribonukleinsäure)
DNAse	Desoxynuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOPE	Phospholipid-Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ; ein Darmbakterium
etc.	et cetera
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure
evtl.	eventuell
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s^2)
gr.	Griechisch
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	H orseradish P eroxidase
i.d.R.	in der Regel
IHF	I ntegration H ost F actor; ein <i>E. coli</i> -Protein
Int	I ntegrase; ein Lambda-Phagen-Protein
KCl	Kaliumchlorid
kb	k ilo b ase (Kilobase)
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
lat.	Lateinisch
mbar	Millibar
M	Molar

Abkürzung	Beschreibung
MDa	Megadalton
MAO-B	Monoaminoxidase vom Typ B
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mind.	mindestens
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	m essenger R ibonucleic A cid
N ₂	flüssiger Stickstoff
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
nM	Nanomolar
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Oac	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
OD _{660, 600, 260, 280}	O ptical D ensity (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge 660 nm, 600 nm, 260 nm, 280 nm
ORF	O pen R eadin F rame (offener Leserahmen); eine zwischen einem Start- und einem Stop-Codon liegende fortlaufende längere Reihe von Nukleotid-Triplets, die in eine Polypeptidkette übersetzt werden kann
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	P olymerase C hain R eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	P rotein e xpression
pg	Pikogramm
pmol	Pikomolar
rel.	relativ
RNA	R ibonucleic A cid (Ribonukleinsäure)
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	R aum t emperatur (etwa 25°C)
RT-PCR	R everse T ranskriptions- P CR
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	S DS- P olyacrylamid g elelektrophorese
sec	Sekunde
Sf9	eine <i>Spodoptera frugiperda</i> -Zelllinie
TAE	Tris-Acetic-EDTA (Tris-Eisessig-EDTA)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> ; ein thermophiles Bakterium
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Tween 20	Polyoxyethylen (ca. 20) sorbitan monooleate
u.a.	unter anderem
UCH-L1	Ubiquitin-C-terminale Hydrolase L1
UV	U ltraviolett
U	U nit (veraltete Einheit zur Angabe der Enzymaktivität; durch Katal ersetzt)
VA	V irus a mplifikation
Vol	Volumen
Xis	E xisionase; ein Lambda-Phagen-Protein
z.B.	zum Beispiel

2 Einleitung

2.1 Das Gehirn

Das Gehirn (lat.: *Cerebrum*, gr.: *Encephalon*) bildet zusammen mit dem Rückenmark das Zentralnervensystem. Das Gehirn ist der Abschnitt des zentralen Nervensystems des Menschen, in dem die Steuerungszentren des Körpers zusammengefasst sind: die Sinneszentren und die übergeordneten Schaltzentren (Koordinations- und Assoziationszentren). Das Hirngewebe wird unmittelbar von der sehr dünnen, gefäßreichen weichen Hirnhaut (*Pia mater encephali*) bedeckt, über der die Spinnwebshaut (*Arachnoides encephali*) liegt. Zwischen beiden befindet sich ein mit Gehirnflüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*) gefüllter Raum. Die äußerste, harte Hirnhaut aus straffem Bindegewebe (*Dura mater encephali*) liegt der Schädelhöhle innen an.

Anatomisch gliedert man das Gehirn in verschiedene Bereiche, die sich auch in ihren Funktionen wesentlich voneinander unterscheiden.

Das verlängerte Mark (*Medulla oblongata*), auch als Nachhirn (*Myelencephalon*) bezeichnet, schließt sich nach oben an das Rückenmark an und setzt sich über den Bereich der Brücke (*Pons*) in das Mittelhirn (*Mesencephalon*) fort. Hier liegen Gebiete, die für die Regulation von Atmung, Herzfrequenz, Blutdruck und anderer vegetativer Funktionen wesentlich sind. Das Dach des Mittelhirns (*Tectum mesencephali*) übernimmt die Verarbeitung optischer Reize und gilt als übergeordnetes Reflexzentrum, da es von allen Sinnesbahnen Informationen erhält. Das Nachhirn ist die Schaltstelle vom Rückenmark zum eigentlichen Gehirn bzw. die Durchgangsstelle von Nervenbahnen, deren Axone vom Gehirn bis ins Rückenmark reichen (Pyramidenbahnen). Das Nachhirn beinhaltet aber auch erste übergeordnete Reflexzentren, die für das Niesen, Husten, den Tränenfluss, das Kauen, den Speichelfluss, das Schlucken und Erbrechen verantwortlich sind.

Dem Nachhirn liegt nach hinten das Kleinhirn (*Cerebellum*) an, das ein wichtiges Koordinationsorgan für Bewegungsabläufe ist, und das im Zusammenspiel mit höheren motorischen Zentren, dem Lagesinn und dem Labyrinthorgan des Innenohres für die Erhaltung des Gleichgewichtes sorgt. Außerdem wird durch das Kleinhirn der Muskeltonus kontrolliert.

An das Mittelhirn schließt sich nach oben das Zwischenhirn (*Diencephalon*) an, das in vier Ebenen aufgebaut ist. Dies sind von dorsal nach ventral der *Epithalamus*, der *Thalamus*, der *Subthalamus* und der *Hypothalamus*. Die Kerne des *Epithalamus* stehen mit zuleitenden (afferenten) Nervenfasern aus dem limbischen System des Großhirns, der Riechbahn und dem *Hypothalamus* in Verbindung. Wegleitende (efferente) Fasern führen von hier aus zum Mittelhirn und der *Formatio reticularis* des Hirnstamms. Diese epithalamischen Verbindungen sollen den Stoffwechsel-, den Hormon- und den Wärmehaushalt beeinflussen. Der *Thalamus* bildet eine bedeutende Durchgangsstelle für alle zum Großhirn ziehenden Bahnen, die Erregungen aus dem Sinnessystem führen. Von sämtlichen Kerngebieten des *Thalamus* verlaufen Bahnen zur Großhirnrinde. Im *Thalamus* erfolgt die Umschaltung der aufsteigenden sensorischen Bahnen auf Neurone des Großhirns und damit die zentrale Umschaltung von Sinnesorganen auf die Muskulatur. Der unterhalb des *Thalamus* gelegene *Hypothalamus* mit der *Hypophyse* ist Teil der inneren Sekretion, sowie das Steuerungszentrum für vegetative Funktionen wie Schlafen, Nahrungsaufnahme und Sexualfunktionen. So steuert der *Hypothalamus* z.B. die Regulation der Körpertemperatur, die Hormonsekretion, Durst und

Hunger, Schlaf sowie sexuelle Reifungsvorgänge. Seinen Einfluss übt er zum einen durch direkten Kontakt seiner Neuronen mit untergeordneten Zentren aus, zum anderen durch die Freisetzung von Hormonen oder Hormon-Vorstufen über die *Hypophyse*. Die *Hypophyse* besteht aus einem Vorder- und einem Hinterlappen. Der Vorderlappen (*Adenohypophyse*) besteht aus hormonbereitenden Zellen und ist eine Drüse mit innerer Sekretion. Der Hinterlappen (*Neurohypophyse*) ist eine Ausstülpung des Zwischenhirnbodens, in den das im *Hypothalamus* vom *Nucleus supraopticus* hergestellte Adiuretin und das im *Hypothalamus* vom *Nucleus paraventricularis* hergestellte Oxytocin entlang von Nervenfasern transportiert und gespeichert wird, um im Bedarfsfall freigesetzt zu werden. Im Zwischenhirn liegen weiterhin wichtige Steuerungsgebiete für die unwillkürliche Motorik, die zusammen mit unter der Großhirnrinde gelegenen Kerngebieten für das flüssige Ablaufen von willkürlich eingeleiteten Bewegungen, von Ausdrucksbewegungen und automatischen Bewegungsabläufen sorgen.

Das Großhirn (*Telencephalon*) wird durch einen tiefen, längsgestellten Einschnitt (*Fissura longitudinalis cerebri*) in zwei Halbkugeln (Hemisphären) geteilt. Beide Großhirnhemisphären werden durch zahlreiche Nervenbahnen (Kommissuren) miteinander verbunden, die den Balken (*Corpus callosum*) bilden. Die Großhirnhemisphären bestehen jeweils aus vier Hirnlappen: dem Stirnlappen (*Lobus frontalis*), dem Scheitellappen (*Lobus parietalis*), dem Schläfenlappen (*Lobus temporalis*) und dem Hinterhauptslappen (*Lobus occipitalis*). Die Großhirnrinde bedeckt als 1,5 – 4,5 mm dicke Ganglienzellschicht die gesamte Hirnoberfläche. Zur Oberflächenvergrößerung ist die Hirnrinde (*Cortex*) in Windungen (*Gyri*) und Furchen (*Sulci*) gefaltet. Die evolutionär sehr alten Bereiche der Hirnrinde bilden den Riechkolben (*Bulbus olfactorius*) und das eigentliche Riechhirn (*Cortex olfactorius*). Das Großhirnmark besteht überwiegend aus myelierten Nervenfasern (*Neuriten*), die als Basalganglien bezeichnet werden. In ihnen sind Bereiche eingegliedert, die als graue Substanz (ohne Myelin) schon optisch vom Mark abgegrenzt sind: der Mandelkern und der Streifenkörper. Diese Bereiche sind die Umschaltzentren der Nervenbahnen zur bzw. von der Großhirnrinde. Der Streifenkörper verbindet Großhirnrindenareale mit dem *Thalamus* und seinem schwarzen Kern, der *Substantia Nigra*. An das Großhirn sind integrative Funktionen wie z.B. die Verarbeitung von Sinneseindrücken, willkürliche Motorik, Bewusstsein, Gedächtnis, Sprechen und Schreiben gebunden.

Eine funktionell verknüpfte Gruppe von stammesgeschichtlich älteren Kernen und Rindenbereichen wird als Limbisches System bezeichnet, das den Balken und die Stammhirnganglien wie ein Saum umgibt. Zum Limbischen System gehört der *Hippocampus* und das Gewölbe (*Fornix*). Vom *Hippocampus* aus ziehen Nervenfasern zum im Mittelhirn gelegenen *Hypothalamus*, dem es übergeordnet ist. Dem *Hippocampus* werden Funktionen bei der Langzeiterinnerung zugeschrieben. Zu den bisher bekannten Funktionen des Limbischen Systems gehört u.a. die Geruchswahrnehmung und die Erinnerung an Gerüche. Seine Bedeutung liegt aber vor allem in der Regulierung unbewusster Verhaltensweisen. Emotionale Verhaltensformen wie Wut, Angst, Freude und Lust werden im Limbischen System erzeugt. Da das Limbische System eng mit dem *Hypothalamus* verbunden ist, kommt es bei solchen emotionalen Reaktionen zu vegetativen Erscheinungen wie beschleunigte Herzfrequenz, Blutdruckanstieg und vermehrter Schweißsekretion. Das Limbische System beeinflusst aber auch die Tätigkeiten innerer Organe wie dem Darm, das Herz und die Gallenblase.

(H. J. von Brandis und W. Schönberger, 1991; W. Buselmeier, 1997)

Die verschiedenen Abschnitte des Gehirns stehen mit dem Körper und den Sinnesorganen über die an der Hirnbasis ein- bzw. austretenden Hirnnerven in Verbindung.

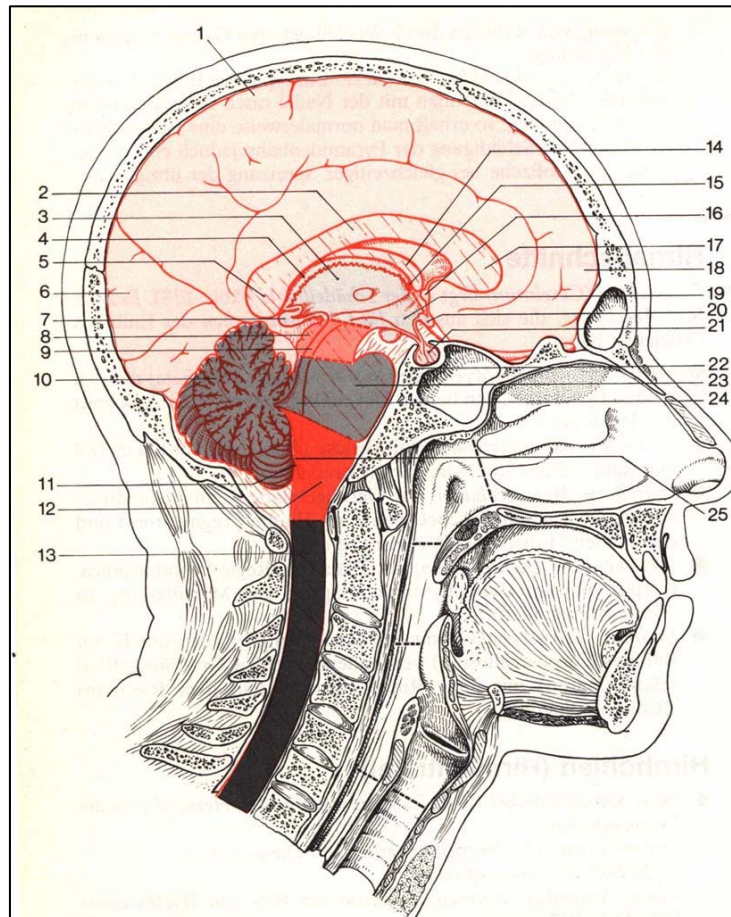


Abbildung 1: Gliederung des menschlichen Gehirns.

Mittelschnitt durch den Kopf eines erwachsenen Mannes. Ansicht von medial auf die linke Hälfte. Mittelhirn, Zwischenhirn, Brücke und verlängertes Rückenmark bilden den Hirnstamm.

A. Faller „Der Körper des Menschen“ (1995)

- | | |
|--|--|
| 1 Scheitellappen (<i>Lobus parietalis</i>) | 12 Verlängertes Mark |
| 2 Balkenkörper (<i>Truncus corporis callosi</i>) | (<i>Medulla oblongata</i> = <i>Myelencephalon</i>) |
| 3 Thalamus | 13 Rückenmark (<i>Medulla spinalis</i>) |
| 4 Adergeflecht des dritten Ventrikels | 14 Gewölbe (<i>Fornix</i>) |
| (<i>Plexus choroideus ventriculi tertii</i>) | 15 Interventrikularloch (<i>Foramen</i> |
| 5 Balkenwulst (<i>Splenium corporis callosi</i>) | <i>interventriculare</i>) |
| 6 Hinterhauptlappen (<i>Lobus occipitalis</i>) | 16 Vordere Kommissur (<i>Commissura anterior</i>) |
| 7 Zirbeldrüse (<i>Corpus pineale</i>) | 17 Balkenknie (<i>Genu corporis callosi</i>) |
| 8 Vierhügelplatte | 18 Stirnlappen (<i>Lobus frontalis</i>) |
| (<i>Lamina quadrigemina</i> = <i>Tectum mesencephali</i>) | 19 <i>Regio hypothalamica</i> |
| 9 <i>Aquaeductus</i> | 20 Sehnervenkreuzung |
| 10 Schnitt durch den Kleinhirnwurm (<i>Vermis cerebelli</i>) mit Lebensbaum (<i>Arbor vitae</i>) | 21 Hypophysenvorderlappen (<i>Adenohypophyse</i>) |
| 11 Loch im Dach des vierten Ventrikels | 22 Hypophysengrube des Keilbeinkörpers |
| (<i>Apertura mediana</i>) | 23 Brücke (<i>Pons</i>) |
| | 24 Vierter Ventrikel (<i>Ventriculus quartus</i>) |
| | 25 Adergeflecht der vierten Hirnkammer |
| | (<i>Plexus choroideus ventriculi quarti</i>) |

Im Wesentlichen besteht das Gehirn aus zwei Zelltypen: den Gliazellen (ca. 10^{13}), denen hauptsächlich Stütz- und Ernährungsfunktionen zugeschrieben werden, und den Nervenzellen (ca. 10^{12}), die mehrere tausend verschiedene Typen bilden.

In den verschiedenen Hirnabschnitten sind die Zellen in unterschiedlicher Architektur organisiert. So bilden sie im verlängerten Mark und im Mittelhirn ein Netzwerk (retikuläres System), im Zwischenhirn konzentrieren sie sich zu Nervenkerne oder Ganglien, und im Großhirn und Kleinhirn grenzen sie sich als oberflächlich gelegene Rinde von einem Mark-Anteil aus Nervenfasern ab.

Die Fortsätze der Nervenzellen, die Nervenfasern, verbinden einzelne Nervenzellen untereinander und, in Faserbündeln (*Tractus*) zusammengefasst, verbinden sie die verschiedenen Hirnabschnitte. Faserbündel, die die weitgehend symmetrischen Gehirnhälften der beiden Seiten verbinden, werden als Kommissuren bezeichnet. Die größte dieser Kommissuren ist der oberhalb des Zwischenhirnes gelegene Balken.

(H. J. von Brandis und W. Schönberger, 1991; W. Buselmeier, 1997)

2.2 Morbus Parkinson

Das Krankheitsbild, das im Volksmund auch als Schüttellähmung bezeichnet wird, war bereits den alten Ägyptern bekannt und wurde von James Parkinson (1755-1824), einem Londoner Chirurgen und Paläontologen, 1817 erstmals systematisch beschrieben.

Der Morbus Parkinson ist eine der verbreitetsten neurologischen Krankheiten mit komplexen klinischen Merkmalen, an der vorwiegend ältere Menschen erkranken. So sind etwa 1-2 % der Bevölkerung über 60 Jahre von dieser Krankheit betroffen (J. D. Dächsel *et al.*, 2005). Der Verlauf der Parkinsonschen Krankheit ist i.d.R. langsam fortschreitend und nicht aufzuhalten.

Der Morbus Parkinson ist eine chronisch-degenerative Stammganglienerkrankung, die vor allem durch Bewegungsstörungen gekennzeichnet ist.

Die Symptome kommen durch die Degeneration der melaninhaltigen dopaminergen Neurone in der *Substantia Nigra Pars Compacta* zustande.

Bei der *Substantia Nigra* handelt es sich um einen Kernkomplex im Bereich des Mittelhirns (siehe Abbildung 2), der durch einen hohen intrazellulären Gehalt an Eisen und Melanin dunkel gefärbt erscheint. Man unterscheidet morphologisch eine rötliche *Substantia Nigra Pars Reticulata*, deren Nervenzellen durch einen hohen Eisengehalt auffallen, und eine dunkle *Substantia Nigra Pars Compacta* mit dicht gelagerten melaninhaltigen Neuronen.

Melanin ist das Endprodukt der Verstoffwechselung von Dopamin, einer Transmittersubstanz, die für die Übermittlung der Information vom Gehirn geplanter Bewegungsabläufe innerhalb der Basalganglien nötig ist.

Der Ausfall dieser dopaminergen Zellen der *Substantia Nigra Pars Compacta* führt zu einem Mangel an Dopamin in diesem Hirnbereich, vor allem im *Striatum*, und zu einem funktionellen Überwiegen gegenläufig wirksamer acetylcholinergischer Neuronensysteme. Im *Striatum* treffen die Informationen aus der gesamten Großhirnrinde ein. Die fehlende Stimulation im *Striatum* durch einen Dopamin-Mangel führt letztendlich zu einer Verminderung von gewünschten Bewegungsabläufen, so dass die für die Parkinson-Krankheit typischen Symptome (siehe 2.2.1) auftreten.

Es gibt verschiedene Ursachen für das Absterben der dopaminergen Neurone.

Bei 90 % der Fälle sind die Ursachen ungeklärt und man spricht von idiopathischem Parkinsonismus. Für seine Entstehung wird eine multifaktorielle Kombination aus Umwelt- und genetischen Faktoren angenommen. Man geht davon aus, dass der Morbus Parkinson nicht eine einzelne Erkrankung mit einer einzigen Ursache ist, sondern dass unterschiedliche Krankheitsprozesse als gemeinsame „Endstrecke“ in die nigrale Degeneration mit anschließendem Absterben von Nervenzellen in der *Substantia Nigra* münden und somit ein Parkinson-Syndrom verursachen können.

Gestützt wird diese These dadurch, dass Parkinson auch nach einer Hirnhautentzündung entstehen kann (postenzephalitischer Parkinson) oder auch durch bestimmte giftige Substanzen, wie dem chemischen Derivat des Heroins 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-TetrahydroPyridin (MPTP) oder Neuroleptika, die die *Substantia Nigra* schädigen (toxischer Parkinson). Außerdem gibt es Stoffwechselerkrankungen, deren Abfallprodukte hirnschädlich sind und u.a. Parkinson auslösen können (metabolischer Parkinson). Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung von Parkinson sind Hirntumore, die u.a. die *Substantia Nigra* zersetzen.

Aufgrund des Absterbens der dopaminergen Zellen, die das dunkle Pigment Melanin enthalten, ist die *Substantia Nigra* im Gehirn eines an Parkinson erkrankten Menschen viel heller als die im Gehirn eines gesunden Menschen (siehe Abbildung 2).

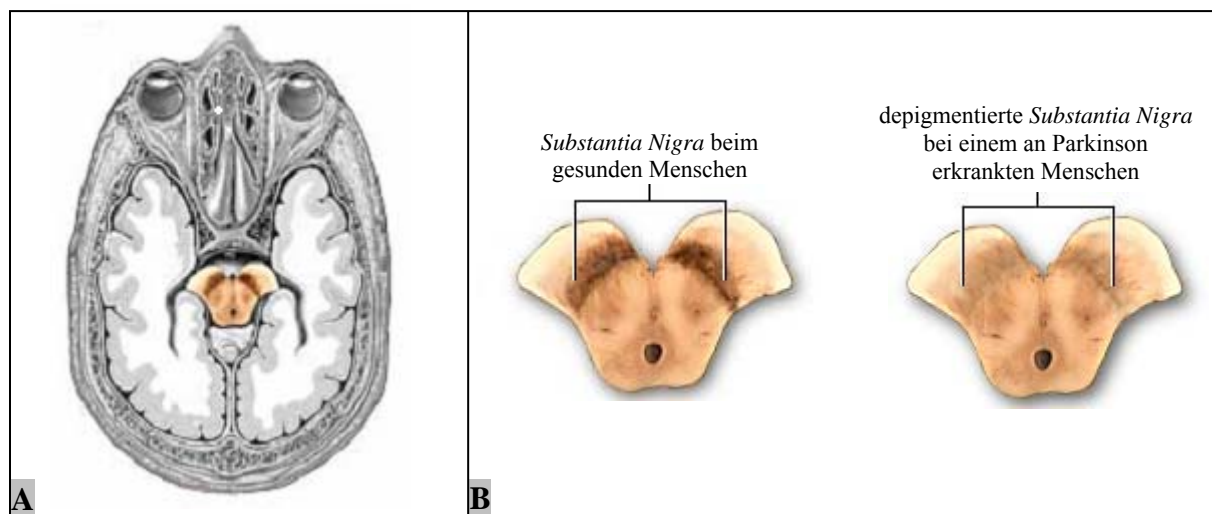


Abbildung 2: Die *Substantia Nigra* im menschlichen Gehirn.

A: Lage der *Substantia Nigra* im Menschen. **B:** Beim gesunden Menschen ist die *Substantia Nigra* deutlich dunkel pigmentiert, während im Fall des Morbus Parkinson die streifenförmige *Substantia Nigra* depigmentiert ist und damit wesentlich heller erscheint.

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/images/ency/fullsize/19515.jpg> (modifiziert)

2.2.1 Symptome des Morbus Parkinson

Typische Symptome des Morbus Parkinson sind u.a. grobschlägiges Zittern von Kopf und Armen besonders in Ruhe (*Tremor*), erhöhte Muskelspannung (*Rigor*) mit rigider Erschwerung der Bewegungen, allgemeine Bewegungsarmut und –verlangsamung (*Akinese*, *Bradykinese*) mit Verarmung der Ausdrucks- und Mitbewegungen, und Gleichgewichtsstörungen (*posturale Störungen*).

Unter der *Bradykinese* versteht man die Bewegungsverlangsamung, eine Verminderung von Spontanbewegungen (Gestik, Mitschwingen der Arme beim Gehen) und eine Hemmung des Bewegungsapparates. Nach mehrjährigem Krankheitsverlauf kommt es zusätzlich zu deutlichen Haltungsstörungen (Beugehaltung des Oberkörpers mit angewinkelten Armen und gebeugten Hüften und Knien). Auch im Gesicht lässt sich an der gestörten spontanen Gesichtsmotorik (*Hypomimie*) die fortschreitende Bewegungsarmut erkennen. Die Stimme wird im Laufe der Erkrankung leise, monoton und heiser (*Hypophonie*). Dadurch, dass auch der Schluckakt in Mitleidenschaft gezogen wird und die Patienten zu selten schlucken, läuft ihnen zeitweise Speichel aus dem Mund (*Sialorrhoe*).

Bei Untersuchungen des *Rigors* zeigt sich der erhöhte Muskeltonus in einem charakteristischen zähen Widerstand bei passiven Bewegungen in einem Gelenk. Der *Rigor* tritt häufig zunächst in den Muskelgruppen des Schulter- und Hüftgürtels auf. Einseitig beginnender *Rigor* wird am verminderten Mitschwingen des Armes auf der betroffenen Seite beim Gehen deutlich.

Der *Tremor* beginnt fast immer einseitig, kann aber im Verlauf der Erkrankung auch beide Körperhälften betreffen. Er manifestiert sich an den Händen und Füßen, selten ist auch der Kopf oder das Kinn betroffen. Bezeichnend für den Ruhetremor ist, dass er sich bei vollkommener Entspannung verstärkt und häufig dann erst sichtbar wird.

Eine große Anzahl von Parkinson-Kranken entwickelt im Krankheitsverlauf noch unterschiedliche Kombinationen von neuropsychologischen bzw. psychiatrischen und vegetativen Zusatzsymptomen.

Zu den pathologischen Charakteristika von Morbus Parkinson gehört neben dem Mangel an Dopamin und dem damit verbundenen Verlust von Dopamin-Metaboliten (z.B. Homovanillinsäure) auch der Mangel an 3,4-Dihydroxyphenylacetat und seines biosynthetischen Enzyms Tyrosin-Hydroxylase, der Verlust von Dopamin-Transportern im *Striatum* und der *Substantia Nigra*, der Verlust von *Locus Ceruleus*-Neuronen ebenso wie das Vorhandensein sog. Lewy-Körperchen, die vorwiegend im Zytoplasma der dopaminergen Neuronen in der *Substantia Nigra* vorkommen (R. Krüger *et al.*, 2002).

2.2.2 Therapie-Methoden

Die Behandlung des Morbus Parkinson erfolgt, abgesehen von der obligatorischen Heilgymnastik, medikamentös mit Antiparkinsonmitteln.

Die medikamentöse Therapie hat zum Ziel, das fehlende Dopamin im Gehirn zu ersetzen und so die Krankheitszeichen zu verringern.

Man verwendet Medikamente, die direkt das Dopamin ersetzen (Levodopa, Dopaminagonisten), Medikamente, die die Konzentration des restlichen Dopamins erhöhen (Hemmer der **Mono-Amin-Oxydase** vom Typ **B**, **Catechol-O-Methyl-Transferase**-Hemmer, Amantadine) und Substanzen, die bekannte Gegenspieler des Dopamins hemmen (Anticholinergika).

MAO-B-Hemmer (Hemmer der **MonoAminOxydase** vom Typ **B**) verhindern den Abbau des körpereigenen und des von außen zugeführten Dopamins. Es handelt sich dabei um eine Medikamentengruppe, die ein dopaminabbauendes Enzym, die Monoaminoxidase vom Typ B, hemmen und dadurch die Dopamin-Konzentration erhöhen. Man verabreicht diese Medikamente in Kombination mit Levodopa, um den körpereigenen Abbau des Dopamins zu verlangsamen. Die Wirkung des Levodopa wird so verstärkt.

Ähnlich wie die MAO-B-Hemmer wirkt eine weitere Medikamentengruppe, die COMT-Hemmer (Hemmer der **Catechol-O-MethylTransferase**). Durch sie wird ebenfalls der Abbau des Dopamins vermindert und damit die Wirkung des Levodopa-Effektes verlängert.

Amantadin wird als Zusatzmedikament eingesetzt. Es blockiert insbesondere Glutamat-Rezeptoren in der überaktiven indirekten Basalganglienschleife.

Durch die Verabreichung von Antagonisten des Acetylcholins wie Biperiden und Metixen wird das cholinerge System gehemmt, wodurch das Übergewicht cholinergischer Neurotransmitter vermindert werden soll. Acetylcholin-Antagonisten wirken in erster Linie gegen den Tremor.

Die Levodopa-Medikamente sind die Basistherapie des Parkinson-Syndroms und wirken hauptsächlich auf die Symptome Bradykinese/Akinese und Rigor. Nebenwirkungen sind Verwirrheitszustände, Hyperkinesen, Magen-Darm-Beschwerden, Herz- und Kreislaufstörungen.

Nebenwirkungen der Anticholinergika sind Verwirrheitszustände, bei Langzeitanwendung können Gedächtnisvermindierungen auftreten.

Sofern eine chemische Therapie nicht mehr zum Erfolg führt, steht die Implantation eines elektrischen Schrittmachers zur Diskussion. Durch eine solche stereotaktische Operation können bestimmte überaktive Kerngebiete innerhalb der Basalganglien wie z.B. der *Nucleus Subthalamicus* ausgeschaltet werden. Auf diesem Wege wird versucht, das gestörte Gleichgewicht zwischen den Projektionswegen wiederherzustellen.

2.2.3 Parkinson-Genetik

Beim Morbus Parkinson unterscheidet man zwischen einer sporadischen und einer hereditären Form.

Fast 90 % aller Parkinsoner leiden an der sporadischen, idiopathischen Parkinson-Form. Daneben gibt es noch hereditäre Fälle von Parkinsonismus. Eine Beteiligung hereditärer Faktoren an der Ursache des Parkinson-Syndroms wurde seit jeher vermutet, und sowohl klinisch-epidemiologische als auch molekulargenetische Untersuchungen konnten eine genetische Beteiligung am Morbus Parkinson bzw. an verschiedenen Parkinson-Syndromen zeigen. Bereits 1867 bemerkte der französische Neurologe Jean Martin Charcot (1825-1893), dass eine familiäre Häufung der Erkrankung vorlag. Diese hereditäre Hypothese wurde später durch Ergebnisse aus der klinischen Epidemiologie gestützt, die mit unterschiedlichen Forschungsansätzen erhoben wurden: Fall-Kontrollstudien und Familienuntersuchungen, Zwillingsstudien und Analyse großer Stammbäume mit mehreren vom Morbus Parkinson betroffenen Familienmitgliedern („Multicase-Familien“).

Fortschritte in der molekularen Neurogenetik haben in jüngerer Zeit zur Identifizierung verschiedener „Parkinson-Gene“ und „-Genorte“ geführt (siehe Tabelle 12).

Mutationen im alpha-Synuclein-Gen (PARK1) und im Gen, das für die Ubiquitin-C-terminale Hydrolase L1 kodiert (PARK5), sowie in drei weiteren Genorten (PARK3, PARK4 und PARK8) von bisher unbekannten Genen wurden im Zusammenhang mit sehr seltenen autosomal-dominant vererbten Parkinson-Syndromen beschrieben.

Charakteristisch für die autosomal-dominant vererbare Form von Parkinson sind die sog. Lewy-Körperchen (siehe Abbildung 3), die vor allem in der *Substantia Nigra*, aber auch in anderen Regionen des Nervensystems zu finden sind (L. Schöls *et al.*, 2001).

Lewy-Körperchen sind eosinophile, intraneurale Einschlusskörperchen im Gehirn, die aus Aggregaten von ungewöhnlich stark angehäuften, ubiquitinierten zytoplasmatischen Proteinen bestehen (K. Tanaka *et al.*, 2001). Man vermutet, dass die Nervenzellen auf dem Wege der Aggregatbildung versuchen, toxische Substanzen wie etwa fehlerhafte Proteine zu beseitigen, z.B. auch für den Fall, dass der in der Regel dafür benutzte zytosolische Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg gestört ist oder nicht ausreicht (L. Schöls *et al.*, 2001).

Locus Name	chromosomale Lokalisation	Gen-Produkt	Erbgang	Lewy-Körperchen-Pathologie	spezifische klinische Merkmale
PARK1	4q21	alpha-Synuclein	autosomal-dominant	ja	Demenz
PARK2	6q25.2-27	Parkin	autosomal-rezessiv	nein	früher Krankheitsausbruch, frühes Auftreten Levodopa-induzierter Dyskinesien, Besserung der Symptomatik nach Schlaf, Fußdystonie
PARK3	2p13	unbekannt	autosomal-dominant	ja	Demenz
PARK4	4p15	unbekannt	autosomal-dominant	ja	Demenz, Tremor
PARK5	4p14	Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1	autosomal-dominant	unbekannt	nicht beschrieben
PARK6	1q35-36	Pink1	autosomal-rezessiv	unbekannt	früher Krankheitsausbruch, dominanter Tremor
PARK7	1q36	DJ-1	autosomal-rezessiv	unbekannt	früher Krankheitsausbruch, Dystonia, psychische Störungen
PARK8	12p11.2-q13.1	unbekannt	autosomal-dominant	unbekannt	später Krankheitsausbruch

Tabelle 1: Gene und ihre genetische Verknüpfung mit dem Morbus Parkinson.

Bei hereditären Fällen von Parkinsonismus liegt das Augenmerk vor allem auf den folgenden drei Genen (rot markiert): *parkin*, *alpha-Synuclein* und *Ubiquitin-C-terminale Hydrolase L1*. Mutationen in diesen Genen lösen die Krankheit mit hoher Penetranz aus.

R. Krüger *et al.*, 2002 (modifiziert)

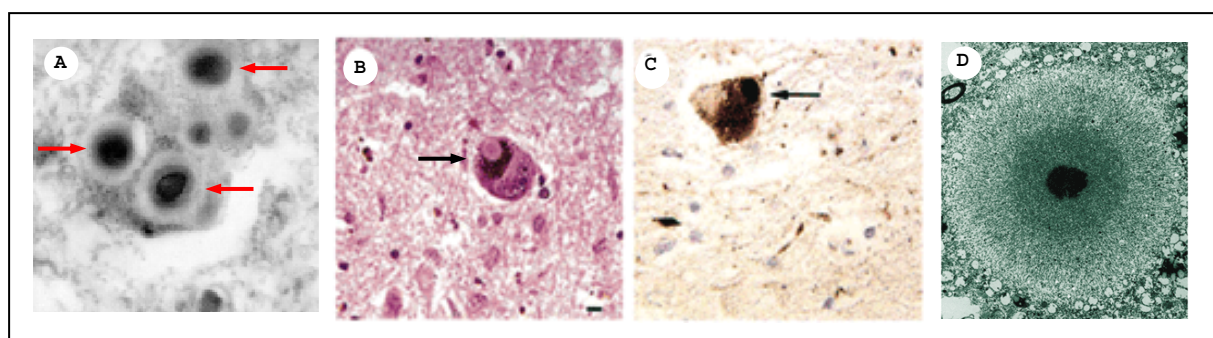


Abbildung 3: Elektronen-mikroskopische Aufnahmen von Lewy-Körperchen.

Lewy-Körperchen sind kleine kugelförmige, alpha-Synuclein-haltige Einschlüsse. **A:** Lewy-Körperchen in den Nervenzellen eines Parkinson-Patienten. **B:** Mit Haematoxylin/Eosin angefärbtes Lewy-Körperchen. **C:** Mit einem spezifischen Antikörper angefärbtes Protein alpha-Synuclein in Lewy-Körperchen. **D:** Lewy-Körperchen bestehen aus einem dichten granulären Ring, der von einem Hof sternförmiger Filamenten umgeben ist.

Abbildung A: L. Schöls *et al.* (2001). Abbildung B and C © Macmillan Magazines Ltd. Abbildung D ist modifiziert mit Genehmigung von Ref. 105 © (1996) American Association of Neuropathologists.

Sehr viel häufiger und daher auch von klinischer Bedeutung sind dagegen Mutationen im Parkin-Gen (PARK2). Diese Mutationen sind mit einem autosomal-rezessiv vererbten Parkinsonismus mit frühem Krankheitsbeginn assoziiert, weshalb er auch als Juveniler Parkinsonismus bezeichnet wird.

Das Spektrum von Parkin-Mutationen variiert von einzelnen Punktmutationen bis hin zu Deletionen ganzer Exons (Exon 3, Exon 4) oder größeren Teilen des Gens. In Abhängigkeit von der Art der Mutation variiert der klinische Phänotyp und der Zeitpunkt des Ausbruchs der Krankheit (M. Saito *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zur dominanten Form kommt es bei der rezessiven Form von Parkinsonismus nicht zur Bildung von Lewy-Körperchen. Patienten mit einer solchen autosomal-rezessiven Form von Parkinsonismus wurden als eigene Krankheitsentität erstmals von Yasuhiro Yamamura beschrieben: frühes Erkrankungsalter, Besserung der Symptomatik nach Schlaf, tageszeitliche Abhängigkeit der Symptomausprägung, frühes Auftreten Levodopa-induzierter Dyskinesien, Dystonie als Begleit- oder manchmal sogar als Erstsymptom sowie eine Steigerung der Sehnenreflexe (*Hyperreflexie*).

Zwei weitere Genorte für ein autosomal-rezessives Parkinson-Syndrom wurden kürzlich auf Chromosom 1 lokalisiert: PARK6 und PARK7 (V. Bonifati *et al.*, 2002). Mutationen in diesen Genen sind ebenfalls mit einem Parkinsonismus mit frühem Erkrankungsalter assoziiert. PARK6 kodiert für eine Serin-Threonin-Kinase (Pink1) und PARK7 für das multifunktionelle Protein DJ-1, das unter anderem mit oxidativem Stress assoziiert ist.

Die Expression von PARK1 (alpha-Synuclein) und PARK2 (Parkin) ist auf Nervenzellen, beschränkt und werden insbesondere in den dopaminergen Neuronen der *Substantia Nigra* gefunden, während PARK5 (Ubiquitin-C-terminale Hydrolase L1) im gesamten Gehirn transkribiert wird.

Alle drei Gene sind entweder direkt oder indirekt mit dem Ubiquitin-Proteasom-Abbaupfad für Proteine assoziiert und spielen damit eine Rolle beim Protein-Stoffwechsel und beim Abbau geschädigter, falsch gefalteter oder „alter“ Proteine innerhalb der Zelle.

2.2.4 Das Parkin-Gen *PARK2*

Das Parkin-Gen PARK2 wurde 1998 von einer japanischen Arbeitsgruppe identifiziert.

Das Gen ist auf Chromosom 6 (6q25.2-q7) lokalisiert.

Mit 1.5 Megabasen gehört das Parkin-Gen zu einem der größten Gene im menschlichen Genom.

Es besteht aus 12 Exons.

Der Offene Leserahmen (*Open Reading Frame*, ORF) umfasst 1395 Basenpaare, und die kodierten 465 Aminosäuren haben ein Molekulargewicht von 52 Kilodalton.

Ein besonderes Merkmal des Parkin-Proteins sind die ersten 72 Aminosäuren am Amino-Terminus: diese sind zu 62 % homolog zu Ubiquitin, weswegen dieser Abschnitt auch als *Ubiquitin-like-Domain* bezeichnet wird (siehe Abbildung 4). Dieser Bereich enthält an Position 48 einen hoch-konservierten Lysin-Rest, der essentiell für die Bildung der Polyubiquitin-Kette ist, die als Abbausignal bei der Proteindegradation über den 26S-Proteasom-Abbauweg fungiert (siehe Abbildung 4) (T. Kitada *et al.*, 1998).

MIVFVRFNSS	HGFPEVVDSD	TSIFQLKEVV	AKRQGV PADQ	LRVIFAGKEL	50
RNDWTVQNCD	LDQQSIVHIV	QRPWRKGQEM	NAGTGDDPRN	AAGGCERE PQ	100
SLTRVDLSSS	VLPGDSVGLA	VILHTDSRKD	SPPAGSPAGR	SIYNSFYVYC	150
KGPCQRVQPG	KLRVQCSTCR	QATLTLTQGP	SCWDDVLIPN	RMSGECQSPH	200
CPGTSAEFFF	KCGAHPTSDK	ETPVALHLIA	TNSRNITCIT	CTDVRSPVLV	250
FQCNSRHVIC	LDCFHLYCVT	RLNDRQFVHD	PQLGYSLPCV	AGCPNSLIKE	300
LHHFRILGEE	QYNRYQQYGA	EECVLQMGV	LCPRPGCGAG	LLPEPDQRKV	350
TCEGGNGLGC	GFAFCRECKE	AYHEGECSAV	FEASGTTTQA	YRVDERAAEQ	400
ARWEAASKET	IKKTTKPCPR	CHVPVEKNGG	CMHMKCPQPQ	CRLEWCWNCG	450
CEWNRVCMGD	HWFV				

Abbildung 4: Aminosäuresequenz von Parkin.

Der Teil des Parkin-Proteins mit Homologie zu Ubiquitin ist rot markiert. Cystein- und Histidin-Reste, die die Ring-Box bilden, sind blau markiert. Der für die Ubiquitinketten-Bildung essentielle Lysin-Rest ist grün markiert und unterstrichen.

T. Kitada *et al.*, 1998 (modifiziert)

Parkin verfügt über drei Domänen (siehe Abbildung 5).

Am Amino-Terminus befindet sich die *Ubiquitin-like-Domain* und am Carboxy-Terminus ein Ring-Finger-Motiv, die sog. Ring-Box. Sie besteht aus drei Abschnitten: der Ring 1- und Ring 2-Domäne und der cystein-reichen *In-Between-Ring*-Domäne, die die beiden Ring-Domänen voneinander trennt. Die Ring-Box bindet ein spezifisches Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2-Enzym) und wird deshalb auch als E2-Bindungsstelle bezeichnet.

Die dritte Domäne wird als *Unique Parkin Domain* (UPD) bezeichnet, weil sie keine Ähnlichkeiten zu bisher bekannten Proteinen aufweist (K. Tanaka *et al.*, 2001). Sie verbindet die *Ubiquitin-like-Domain* mit der Ring-Box und enthält Substrat-Erkennungsstellen (B. I. Giasson *et al.*, 2001).

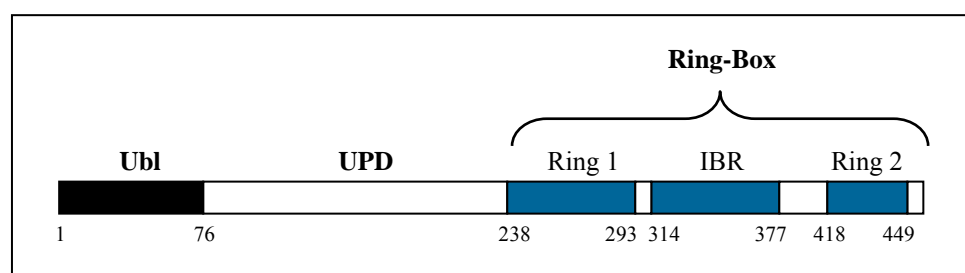


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von Parkin.

Parkin besteht aus mehreren Domänen: einer amino-terminalen *Ubiquitin-like-Domain* (Ubl), der *Unique Parkin Domain* (UPD) und einer carboxy-terminalen Ring-Box-Domäne. Die Ring-Box-Domäne besteht aus zwei Ring-Finger-Motiven (Ring 1 und Ring 2), die durch die *In-Between-Ring*-Domäne (IBR) voneinander getrennt sind.

B. I. Giasson *et al.*, 2001 (modifiziert)

Mit der Ring-Box enthält Parkin zwei strukturelle Motive, die einige Hinweise auf seine Funktion als eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase geben (H. Shimura *et al.*, 2000). Wie viele andere Ring-Finger-Proteine auch, scheint Parkin mit seiner E3-Ligase-Aktivität eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Ubiquitylierung spezifischer, abzubauen Proteine zu spielen (B. I. Giasson *et al.*, 2001).

Zu bereits bekannten Ubiquitylierungssubstraten von Parkin gehören CDCrel, Synphilin-1, der Pael-Rezeptor, die p38-Untereinheit des Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Komplexes, Synaptogamin XI, Tubulin und alphaSp22, eine O-glykosylierte Form von alpha-Synuclein. Diese sehr unterschiedlichen Substrate lassen noch keinen gemeinsamen oder in irgendeiner Weise zusammengehörenden zellulären Weg erkennen.

2.3 Das 26S Proteasom

Durch Hitze oder Oxidation geschädigte, alte, fehlgefaltete oder mutierte Proteine müssen zum Schutz der Zelle abgebaut werden. Ebenso muss ein Abbau zum Erhalten des Aminosäurepools, zur Prozessierung von Vorläuferproteinen, zur Antigenpräsentation und zur Veränderung der Konzentration regulatorischer Proteine erfolgen. Dazu werden Proteine über Proteasen, Exopeptidasen (wie Carboxy- und Aminopeptidasen), und Endopeptidasen (wie Trypsin und Chymotrypsin) abgebaut. Proteasen sind ubiquitär, d.h. sie kommen lysosomal, nicht-lysosomal, extrazellulär und im Endoplasmatischen Reticulum/Golgi-Apparat vor.

Eine wesentliche Komponente des ATP-abhängigen proteolytischen Weges in eukaryontischen Zellen ist das hoch-konservierte Ubiquitin-Proteasom-System, das für den Abbau der meisten zellulären Proteine verantwortlich ist (O. Cux *et al.*, 1996), und an dem auch Parkin beteiligt ist.

Die Vielfalt der Substrate macht das Proteasom zu einem Mitspieler in vielen Zellprozessen, einschließlich der Antwort auf Stress (D. Finley *et al.*, 1987), Zellzyklus-Kontrolle (R. W. King *et al.*, 1996) und Stoffwechseladaptierung (W. E. Mitch *et al.*, 1996).

Das biologische Makromolekül 26S Proteasom ist ein großer multikatalytischer Proteinasen-Komplex (M_R 2.1 MDa), das sowohl im Zytosol als auch im Nukleus von eukaryontischen Zellen zu finden ist. Es setzt sich aus einem Kernkomplex (20S Proteasom) und zwei 19S-Kappenkomplexen zusammen (siehe Abbildung 6).

Der Kanal, der die Längsachse des 20S-Kerns durchspannt, teilt sich in drei Hohlräume, von denen der innere, zentrale Hohlraum die proteolytische (Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche und Peptidyl-Glutamyl-) Aktivität trägt. Diese Proteasen bilden eine neue Klasse, die mit bereits bekannten Proteasen (Serin-, Zink-, Thiol-, Carboxy-Proteasen) nicht näher verwandt sind.

Die ATP-abhängigen 19S-Kappen sorgen zum einen für die spezifische Erkennung der zum Abbau bestimmten (ubiquitinierten) Proteine und zum anderen für ihre Entfaltung, da nur ungefaltete Peptidketten in das Reaktionskompartiment des 20S-Kerns transportiert werden können, in dem sie schließlich abgebaut werden.

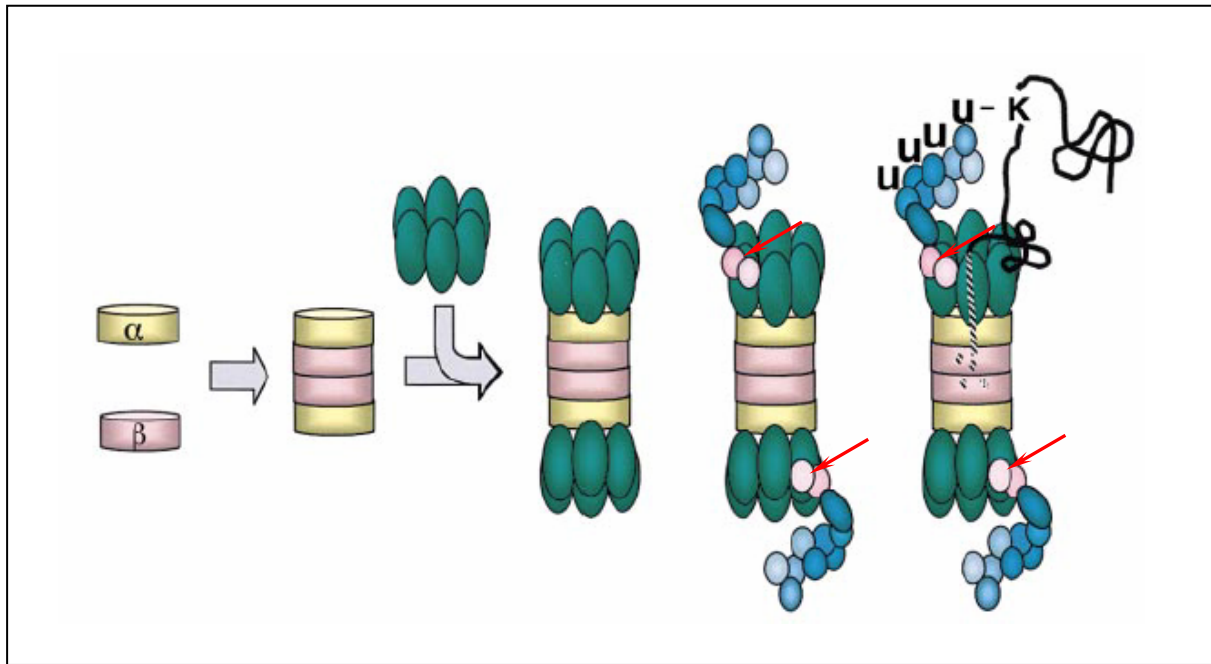


Abbildung 6: Das 26S Proteasom.

Der 20S-Kern besteht aus vier übereinandergelagerten heptameren Ringstrukturen, die einen Hohlzylinder bilden. Die beiden äußeren Ringe (*gelb*) werden von jeweils sieben verschiedenen alpha-Untereinheiten, die beiden inneren Ringe (*rosa*) von jeweils sieben verschiedenen beta-Untereinheiten gebildet. Die proteolytisch aktiven Zentren, an denen die Peptidketten in Oligomere geschnitten werden, befinden sich auf der Innenseite der beta-Ringstruktur. An den Enden des 20S-Kerns sind die 19S-Kappen angehängt, die aus je einem hexameren Ring von Rpt-ATPasen (*grün*) bestehen. Sie enthalten die Bindungsstelle für die zum Abbau bestimmten Proteine und sorgen auch für deren Entfaltung. Zusammen mit zwei weiteren nicht-ATPase-Proteinen (*rote Pfeile*) bilden sie die sog. „Basis“. Neun Rpn-Proteine (*blau*) lagern sich zusammen und bilden den sog. „Deckel“ des Proteasoms.

R. Verma *et al.*, 2000

2.3.1 Modell des Parkin-vermittelten Ubiquitin-26S Proteasom-Proteinabbau-Weges

Fast alle über das proteasomale System abzubauenen Proteine werden für den Abbau durch Anhängen einer Ubiquitinkette markiert. Diese Ubiquitylierung wird von einem komplexen Enzymsystem, dem Ubiquitin-System, durchgeführt, das aus Ubiquitin-aktivierenden Enzymen (E1), Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2) und Substraterkennungsproteinen (E3-Enzyme/E3-Ligasen) besteht.

Der erste Schritt bei der Ubiquitylierung ist die Aktivierung eines Ubiquitin-Moleküls (hoch-konserviertes Protein aus 76 Aminosäuren) mit anschließender Übertragung an eine Sulfhydryl-Gruppe des Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyms. Dies geschieht durch eine ATP-Hydrolyse und unter Mitwirkung eines E1-Enzyms. E1-Enzyme ubiquitinieren die abzubauenen Substrate nie direkt (A. Ciechanover *et al.*, 1981). E2-Enzyme binden schließlich das Ubiquitin an das für den Abbau vorgesehene Substrat. Der Schritt dieser Ubiquitin-Anbindung an das Substrat benötigt die Mithilfe von E3-Enzymen (Ubiquitin-Ligasen) (A. L. Haass *et al.*, 1997). Dabei bindet das Ubiquitin-tragende E2-Enzym an die Ring-Box von Parkin. Über seinen carboxy-terminalen Glycin-Rest reagiert Ubiquitin aus

dieser Parkin-E2-Verbindung mit dem Substrat unter Ausbildung einer Peptidbindung an der ϵ -Aminogruppe einer Lysin-Seitenkette im Substrat (A. Hershko *et al.*, 1980). Diese Reaktion wird von Parkin katalysiert.

In nachfolgenden Reaktionen wird dieses Ubiquitin durch das Anhängen weiterer Ubiquitin-Moleküle zu einer Ubiquitin-Kette an dem Substrat.

Das mit der Ubiquitinkette zum Abbau markierte Protein wird zum 26S Proteasom transportiert und dort abgebaut. Man nimmt an, dass die Ubiquitinkette des abzubauenen Substrates über eine feste Wechselwirkung mit dem proteasomalen „Deckel“ an das 26S Proteasom gebunden wird. Das gebundene Substrat wird dann über die ATPasen des 19S Komplexes entfaltet und in die innere Kammer des 20S-Komplexes hineingezogen, wo schließlich die Proteolyse des Substrates stattfindet. Die für die Entfaltung und den Transport in das Proteasom-Innere benötigte Energie wird dadurch freigesetzt, dass die ATPasen der 19S-Kappen Adenosin-5'-triphosphat zu anorganischem Phosphat und Adenosin-5'-diphosphat hydrolysieren

Eine schematische Darstellung, wie eine Ubiquitinkette an ein zum Abbau bestimmtes Protein gebildet und angehängt wird, ist in Abbildung 7 dargestellt.

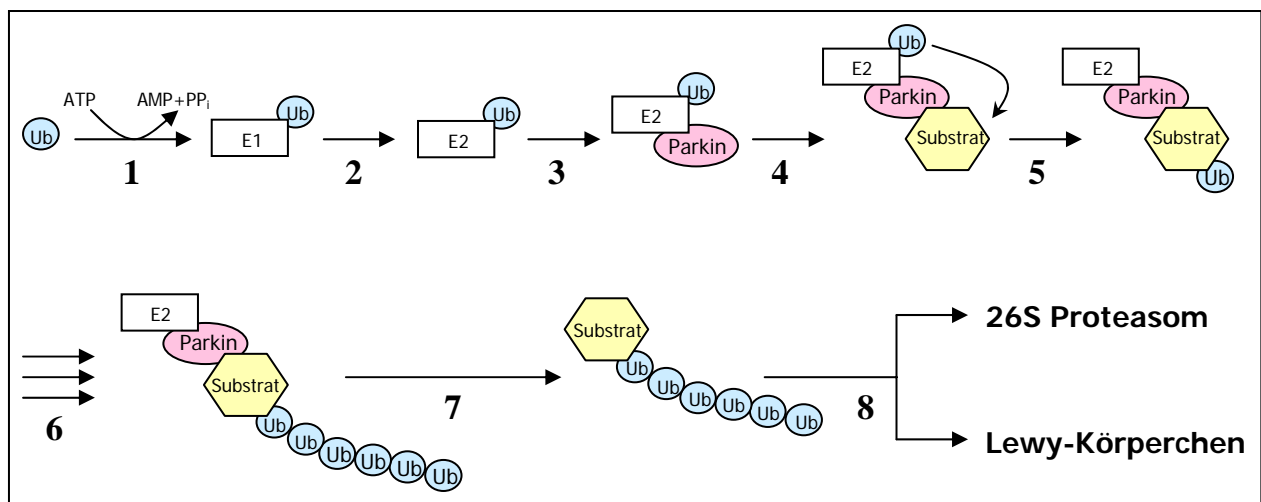


Abbildung 7: Markierung eines zum Abbau bestimmten Proteins mit einer Ubiquitinkette.

Die Markierung über das 26S Proteasom abzubauenen Proteine erfolgt über ein komplexes Enzymsystem.

1 & 2: Aktivierung und Übertragung von Ubiquitin auf E2. **3:** Interaktion des Ubiquitin-tragenden E2-Enzyms mit der Ring-Box von Parkin. **4 & 5:** Ubiquitin reagiert aus dieser Parkin-E2-Verbindung mit dem abzubauenen Substrat unter Ausbildung einer Peptidbindung an der ϵ -Aminogruppe einer Lysin-Seitenkette im Substrat. **6:** Die Ubiquitin-Aktivierung und -Übertragung ist eine Abfolge von sich wiederholenden biochemischen Reaktionen, bei der Ubiquitin-Moleküle nacheinander angehängt werden und eine Ubiquitinkette am Substrat ausbilden. **7:** Entfernung des Parkin-E2-Komplexes nach Beendigung der Ubiquitinketten-Ausbildung. **8:** Abbau des ubiquitinierten Substrates entweder über das 26S Proteasom oder Einschluss in Lewy-Körperchen.

Ub: Ubiquitin; ATP: Adenosin-triphosphat; AMP: Adenosinmonophosphat; PP_i: anorganisches Phosphat; E1: Ubiquitin-aktivierendes Enzym; E2: Ubiquitin-konjugierendes Enzym.

2.4 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit war die Verifizierung und Charakterisierung einer bei einem Yeast-Two-Hybrid-Screen gefundenen Interaktion von Parkin mit der Untereinheit alpha4 des 26S Proteasoms.

Von Parkin ist bekannt, dass es eine E3 Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt und aktiviertes Ubiquitin an Proteine konjugiert, die über das 26S Proteasom abgebaut werden sollen. Die bisher bekannten Ubiquitylierungssubstrate von Parkin sind sehr unterschiedlich und lassen auf keinen gemeinsamen zellulären Weg schließen. Neue Erkenntnisse über die Funktion und den genauen Mechanismus von Parkin erhofft man durch die Identifizierung neuer Interaktionspartner zu gewinnen.

Die Charakterisierung dieser neuen, im Yeast-Two-Hybrid-Assay positiv getesteten Interaktion zwischen Parkin und der proteasomalen Untereinheit alpha4 erfolgte unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses verschiedener Parkin-Fragmente auf die Bindung und unter Berücksichtigung des Einflusses natürlicher Mutationen von Parkin. Damit sollten zum einen Hinweise auf die Bindungsdomäne erhalten werden, zum anderen sollte untersucht werden, ob die Mutationen Auswirkungen auf die Bindung haben.

Dazu wurden, neben einem weiteren Yeast-Two-Hybrid-Assay, Bindungsstudien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt: Co-Lokalisationsstudien, Co-Immunpräzipitationen, Pull Down-Assays und Größenausschluss-Chromatographie.

3 Material

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterien-Schüttelinkubator <i>Multitron HT</i>	Infors GmbH, Einsbach (D)
Blotkammer <i>Criterion Blotterl</i>	Bio Rad, München (D)
Elektrophoresekammer <i>CriterionCell</i>	Bio Rad, München (D)
Elektroporator <i>Gene Pulser® II</i>	Bio Rad, München (D)
Feinwaage <i>PB153</i>	Mettler Toledo, Giessen (D)
FPLC-Anlage <i>ÄKTAexplorer</i>	Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg (D)
Handhomogenisator	Neolab Migge, Heidelberg (D)
HeLa-Zellen-Inkubator <i>Thermo Forma</i>	Thermo Life Science, Egelsbach (D)
Insektenzellen-Inkubator <i>RuMed</i>	Rubarth Apparate GmbH, Laatzen (D)
Kühl/Gefrierkombination	Liebherr
Kühlzentrifuge <i>Megafuge 1.0R</i>	Heraeus, Hanau (D)
Kühlzentrifuge <i>Multifuge 4 Kr</i>	Heraeus, Hanau (D)
Kühlzentrifuge <i>Variofuge 3.0R</i>	Heraeus, Hanau (D)
Laborwaage <i>PB5001</i>	Mettler Toledo, Giessen (D)
Magnetrührer <i>MR3001</i>	Heidolph, Kehlheim (D)
Magnetrührer <i>VarioMag Mono</i>	Vetrieb über Neolab Migge, Heidelberg (D)
Mikroskop <i>Aiovert 200M</i>	Carl Zeiss AG Deutschland, Frankfurt (D)
Mikroskop <i>Leitz Diavert</i>	Leica Microsysteme GmbH, Bensheim (D)
Minizentrifuge <i>C-1200</i>	National Labnet Co. (Vertrieb über Neolab Migge, Heidelberg (D))
Minizentrifuge <i>C-1202</i>	National Labnet Co. (Vertrieb über Neolab Migge, Heidelberg (D))
PCR-Cycler <i>PTC-200</i>	MJ Research (Vertrieb über Bio Rad, München (D))
pH-Meter <i>761 Calimatic</i>	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin (D)
Power Supply <i>E802</i>	Consort, Turnhout (B)
Präzisions-Quarzglas-Küvetten (d = 10 mm)	Hellma GmbH & Co, Müllheim (D)
Rotator	Neolab Migge, Heidelberg (D)
Spektralphotometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Sterilwerkbank <i>Hera Safe</i>	Heraeus, Hanau (D)
Taumel-Rollenmischer <i>CAT RM5</i>	Vetrieb über Neolab Migge, Heidelberg (D)
Taumel-Wipptisch <i>Polymax 1040</i>	Heidolph, Kehlheim (D)
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Tiefkühlschrank (- 80°C)	Heraeus, Hanau (D)
Tischzentrifuge <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus, Hanau (D)
Ultrazentrifuge <i>L8-70M</i>	Beckman Coulter, Krefeld (D)
Wipptisch <i>Rocky</i>	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau (D)
UV-Transilluminator, 254 nm	Alpha Innotech Cooperation (Vertrieb über Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf (D))

Gerät	Hersteller
UV-Transilluminator <i>FluoLink</i> , 336 nm	Biometra GmbH i.L., Göttingen (D)
Vacuum Concentrator	Bachofer (Vertrieb über M&S Laborgeräte GmbH, Wiesloch (D))
Videosystem <i>ChemImagerTM 5500</i>	Alpha Innotech Cooperation (Vertrieb über Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf (D))
Vortexer <i>Vortex Genie 2TM</i>	Bender & Hobein AG, Zürich (CH)
Wasserbad 1083	GFL, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel (D)
Wasserbad <i>UC 8A</i>	Julabo, Seelbach (D)
Zentrifuge <i>Z400K</i>	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen (D)

3.2 Chemikalien

Chemikalie	Molekulargewicht (M _r)	Bezugsquelle
β-Mercaptoethanol	78,13	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
1x Trypsin-EDTA-Lösung		PAA Laboratories, Cölbe (D)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactosid		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
Agarose für Gelelektrophorese		Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	132,14	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg (D)
Ampicillin	371,40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
<i>Aqua ad iniectabilia Braun</i>		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Betain-Hydrochlorid	153,6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Bio Safe Coomassie		BioRad, München (D)
Bradford-Reagenz		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Bromphenolblau	669,99	Merck KGaA, Darmstadt (D)
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)	614,9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Chloramphenicol	323,10	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
D(+)-Glucose	180,16	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
D(+)-Saccharose	342,30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Desoxyribonukleotidtriphosphate		Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (D)
Difco Bacto Agar		BD Biosciences, Heidelberg (D)
Difco Nitrogen Base		BD Biosciences, Heidelberg (D)
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	174,18	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	78,13	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)

Chemikalie	Molekulargewicht (M _r)	Bezugsquelle
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	141,96	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Dulbecco's 1x PBS		PAA Laboratories, Cölbe (D)
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	154,25	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Dulbecco's DMEM-Medium		Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Essigsäure	60,05	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Ethanol, 100%	46,07	Riedel deHaën_Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Ethidiumbromid, 1% (w/v)	394,32	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	372,24	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
EX-CELL TM 400 Medium		JRH Biosciences, Andover/Hampshire (GB)
Ficoll Typ 400	ca. 400 000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Flüssig-Stickstoff	28,01	
Fötale Kälberserum (FCS), Kategorie "EU"		PAA Laboratories, Cölbe (D)
Glutathion, reduziert	307,30	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Glutathion-Agarose		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Glycerin, 86 %	92,10	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Glycerin, pure	92,10	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Glycin	75,07	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid)	238,30	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Hoechst 33258	616,10	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Imidazol	68,08	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Isopropanol, 100%	60,10	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer (NL)
Kaliumchlorid (KCl)	74,56	Fisher Scientific GmbH, Schwerte (D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	136,09	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	147,02	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kanamycin-Monosulfat	852,60	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
LB Broth		Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg (D)
Lipofectin [®] Reagent		Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Lithiumacetat (LiAc)	42,39	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Mg ₂ Cl x 6H ₂ O)	203,30	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	246,48	Merck KGaA, Darmstadt (D)

Chemikalie	Molekulargewicht (M_r)	Bezugsquelle
Methanol, 100 %	32,04	Fluka_ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Milchpulver		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Mowiol		Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach (D)
N,N-Dimethylformamid	73,10	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Trinatriumphosphat-Dodecahydrat ($\text{Na}_3\text{H}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$)	380,10	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Natriumacetat (NaAc)	82,03	E.A. Thomas Chemikalien-Vertriebs-GmbH, Heidelberg (D)
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	Fluka_ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	137,93	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	288,40	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg (D)
Natriumhydroxid (NaOH)	40,00	Merck KGaA, Darmstadt (D)
NiNTA-Agarose		Qiagen GmbH Germany, Hilden (D)
Nonidet P40 (Octylphenol-poly(ethyleneglycolether))	606,00	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
NuSieve GTG Agarose		Biozym Diagnostic GmbH; Hess. Oldendorf (D)
Opti-MEM I Medium		Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Paraformaldehyd		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Penicillin/Streptavidin		PAN Biotech GmbH, Aidenbach (D)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol(25:24:1)		Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	174,20	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
Polyethylenglykol 8 000 (PEG)	7 000 – 9 000	Fluka_ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat (Tween 20)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Ponceau S Solution		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Protein G-Sepharose		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
Proteasen-Inhibitor-Cocktail (Complete, Mini, EDTA-free)		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
Rinderserumalbumin Type H1 (BSA)	ca. 69 000	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg (D)
Salzsäure, 1M und 37%, rauchend	36,46	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer (NL)
Select Agar		Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Sorbitol	182,17	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Transfektionsreagenz <i>FuGENE 6</i>		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)

Chemikalie	Molekulargewicht (M_r)	Bezugsquelle
Sorbitol	182,17	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Transfektionsreagenz <i>FuGENE 6</i>		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	121,14	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Tri-Sodium-Citrat-Dihydrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 3\text{H}_2\text{O}$)	294,10	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Triton-X-100	646,85	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Trypan-Blau		Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

3.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Mung Bean Nuclease (10 U/ μL)	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Proteinase K, PCR-Grad (19 mg/mL)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
T4 DNA Ligase (5 U/ μL)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth (D)
Topoisomerase I	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
<i>Restriktionsenzyme:</i>	
Aat II	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Bgl II	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
BsrGI	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Eag I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
EcoR I	Gibco BRL_Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
EcoR V	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Hind III	Gibco BRL_Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Mlu I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Nde I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Nhe I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Not I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Pvu I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Pvu II	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Sal I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Sma I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Stu I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Xba I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)
Xho I	New England Biolabs, Frankfurt/Main (D)

3.4 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	eingesetzte Verdünnung
Anti-mouse Cy3	AP Biotech / Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg (D)	1 : 400
Goat Anti-mouse Alexa Fluor® 568	Molecular Probes / Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)	1 : 400
Goat Anti-mouse IgG, HRP-konjugiert	Southern Biotech (Vertrieb über Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching (D))	1 : 5 000
Goat Anti-rabbit Alexa Fluor® 568	Molecular Probes / Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)	1 : 400
Goat Anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert	Upstate biotechnology (Vertrieb über Biomol GmbH, Hamburg (D))	1 : 50 000
Mouse Anti-α4	BioTrend Chemikalien GmbH, Köln (D)	1 : 1 000
Mouse Anti-c-myc (9E10)	Babco (Berkeley Antibody Company) (Vertrieb über HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg (D))	1 : 1 000
Mouse Anti-GST	Cell Signaling Technology® (Vertrieb über Neolab Migge, Heidelberg (D))	1 : 2 000
Mouse Anti-HA (12CA5)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)	
Mouse Anti-Vimentin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)	1 : 1 000
Mouse Golgi Marker 130	BD Biosciences, Heidelberg (D)	1 : 1 000
Mouse Penta His™	Qiagen, Hilden (D)	1 : 4 000
Rabbit Anti-γ-Tubulin	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg (D)	1 : 1 000
Rabbit Anti-Parkin	Cell Signaling Technology®, (Vertrieb über Neolab Migge, Heidelberg (D))	1 : 1 000

3.5 Molekularbiologische Kitsysteme

Kit-System	Bezugsquelle
CHEMIGLOW™ West Substrate	Alpha Innotech Cooperation (Vertrieb über Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf (D))
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
GATEWAY™ BP Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
GATEWAY™ LR Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Gel Filtration Calibration Kit, High Molecular Weight	Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg (D)

Kit-System	Bezugsquelle
Gel Filtration Calibration Kit, Low Molecular Weight GELase™ Agarose Gel Digesting	Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg (D) Epicentre Biotechnologies (Vertrieb über Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf (D))
High Pure PCR Product Purification Kit Protein-Standard Bovine Serum Albumen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAwell 96 Ultra Plasmid Kit	Qiagen, Hilden (D)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
VenorGem® Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs GmbH, Berlin (D)

3.6 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
L40ccua	MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2::(lexAop) ₄ -HIS3 ura3::(lexAop) ₈ -lacZ ADE2::(lexAop) ₈ - URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2	Labor Prof. Dr. E.E. Wanker, MDC, Berlin (D)

3.7 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
DB3.1	F ⁻ gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm ^R) xyl-5 λ ⁻ - leu mtl1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
DH10B	F ⁻ , mcrA Δ-(mrr hsdRMS-mcrBC), φ80dlacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK, λ ⁻ , rpsL, endA1, nupG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

3.8 Zellen

Stamm	Herkunft	Bezugsquelle
Sf9	kloniert von G. E. Smith und C. L. Cherry aus der parentalen Zelllinie IPLB-SF 21 AE, die aus pupalem Ovarien-Gewebe des <i>Fall armyworm</i> (Spezies <i>Spodoptera frugiperda</i> , Familie <i>Sciaridae</i> , Ordnung <i>Lepidoptera</i>) stammt	ATCC (Vertrieb über LGC Promochem GmbH, Wesel (D))
HeLa	etabliert aus dem epitheloiden Zervix-Karzinom einer 31-jährigen afroamerikanische Frau 1951 (spätere Diagnose zeigte, dass es sich um ein Adeno-Karzinom gehandelt hatte); erste aneuploide, kontinuierlich kultivierte humane Zelllinie)	DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (D)

3.9 Aminosäure-Stammlösungen

Aminosäure	100x Stammlösung	Bezugsquelle
Adenin	200 mg/100 mL Wasser	Qbiogene, Heidelberg (D)
L-Histidin-HCl	200 mg/100 mL Wasser	Qbiogene, Heidelberg (D)
L-Leucin	1g /100 mL Wasser	Qbiogene, Heidelberg (D)
L-Lysin-HCl	200 mg/100 mL Wasser	Qbiogene, Heidelberg (D)
L-Tryptophan	200 mg/100 mL Wasser	Qbiogene, Heidelberg (D)
Uracil	200 mg/100 mL Wasser	Qbiogene, Heidelberg (D)

Die Aminosäure-Lösungen 2-3 Stunden bei RT rühren, steril filtrieren und bei RT lagern.

3.10 Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotikum	Stammlösung	eingesetzte Verdünnung	Bezugsquelle
Ampicillin	100 mg/mL 50%Ethanol	1 : 1 000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Chloramphenicol	35 mg/mL 100 % Ethanol	1 : 1 000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Gentamycin	50 mg/mL Wasser	1 : 1 000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Kanamycin	30 mg/mL Wasser	1 : 1 000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Tetracyclin	10 mg/mL in Wasser	1 : 1 000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (D)
Zeocin	100 mg/mL Wasser	1 : 4 000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

Die Antibiotika-Lösungen steril filtrieren und bei –20°C lagern.

3.11 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden nach der Phosphoramid-Methode synthetisiert (Herr Wolfgang Weinig, Oligonukleotid-Synthese, DKFZ, Heidelberg).

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')	Länge [Basen]
3pGEX	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	23
AcHLT_F	AGCCATTGTAATGAGACGCAC	21
attB1-Tail_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC	28
attB2-Tail_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG	28
death5	GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGT	26
For-Tail_Parkin	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCATG	31
KanDon Prim R5	CGTTAACGCTAGCATGGA	18
Park2_F1	AAAGCAGGCATGATAGTGTTCAGGTTCAA	32
Park2_F2	AAAGCAGGCATGAGTGGTGAATGCCAATCCCCA	33
Park2_R1	AAAGCTGGGTCTACACGTCGAACCAAGTGGTCC	32
Park2_R2	AAAGCTGGGTCTACCGGTTTGGAATTAAAACAT	33
PSMA7_G_F1	AAAAAAGCAGGCGAAGCCATTGAAACAGATGATC	34
PSMA7_G_R1	AAGAAAGCTGGGTCATGATGCTTTCTTTTGTTC	34
Rev-Tail_Parkin	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTA	32
TF_F2	AAAAAAGCAGGCATAGTGTTCAGGTTCAACTC	35
TF_F220	AAAAAAGCAGGCAAGGAAACATCAGTAGCTTTGC	34
TF_F304	AAAAAAGCAGGCTTCAGGATTCTGGGAGAAGAG	33
TF_F395	AAAAAAGCAGGCGAAAGAGCCGCCGAGC	28
TF_R318	AGCTGGGTCTCAGTACTGCTCTTCTCCCAG	30
TF_R404	AGCTGGGTCTCATTCCCAACGAGCCTGCT	29
TF_R465	AGCTGGGTCTCACACGTCGAACCAAGTGGT	29
v-Ha-ras_G_F1	AAAAAAGCAGGCGTGCGGGATGCAG	25
v-Ha-ras_G_R1	AAGAAAGCTGGGCTAGGCTTCGTCCTTCCTCCT	35

3.12 Software

Programm	Anwendung	Hersteller
AlphaEase [®] FC (FluorChem 8800)	Bilderfassung, Be- arbeitung und Analyse von Gelen und Membranen	Alpha Innotech Cooperation (Vertrieb über Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf (D))
Unicorn [™] , Version 3.10	Kontrolle und Steuerung von Chromatographie- systemen	Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg (D)

3.13 Sonstige Materialien

Material	Bezugsquelle
<i>BaculoGold</i> TM linearisierte Baculovirus-DNA	BD Biosciences, Heidelberg (D)
Chromatographie-Säulchen, leer, <i>Poly-Pre</i> [®] <i>Columns</i>	BioRad, München (D)
Criterion TM Tris-HCl-Gradienten-Gele (10-20%), 18-well	BioRad, München (D)
Deckgläschen, rund <i>Nunc</i> TM <i>Surface</i>	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden (D)
Einmal-Spritzen <i>Omnifix</i> , steril (2 mL, 5 mL und 20 mL)	VWR International, Bruchsal (D)
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (D)
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel (D)
Gelfiltrationssäule <i>HiPrep 16/60 Sephacryl-S 200 HR</i>	Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg (D)
<i>GeneRuler</i> TM DNA Ladder Mix (10 – 0.1 kb)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth (D)
Gewebekulturplatten, 12-well	Greiner Labortechnik, Frickenhausen (D)
Gewebekulturplatten, 6-well	Greiner Labortechnik, Frickenhausen (D)
Heringstestis-DNA <i>Yeastmaker</i> TM <i>Carrier DNA</i>	BD Biosciences, Heidelberg (D)
Kanülen, Luer Lock-Anschluss (Ø 0,9 x 70 mm)	VWR International, Bruchsal (D)
<i>Life Cell Dishes</i>	MatTek Co, Maryland, USA
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Nylon-Membran <i>Magna Charge Nylon Transfer Membran</i>	Micron Separation Incorporation
<i>Precision Plus Protein</i> TM Standard, all blue (250 – 10 kDa)	BioRad, München (D)
PVDF-Membran <i>Hybond-P</i>	Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg (D)
Sephadex-Säulen, 2 mL, <i>Phase Lock Gel</i> TM , heavy	Eppendorf, Hamburg (D)
Spinnerflaschen	Wheaton (USA) (Vertrieb über VWR International, Bruchsal (D))
Sterilfilter <i>Millex-GV</i> , PVDF (0,22 µm und 0,45 µm)	Millipore GmbH, Schwalbach (D)
Zellkulturflaschen mit Filterschraubverschluss (T25, T75 und T175)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen (D)
Zellkulturschalen mit Nocken (94 x 16 mm)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen (D)
Zentrifugen-Röhrchen für Ultrazentrifuge <i>Quick Seal Tubes</i> (13,5 mL)	Beckman Coulter, Krefeld (D)

4 Methoden

4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmide sind extrachromosomale, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die normalerweise eine Größe von 3 kb bis 20 kb aufweisen und sich unabhängig vom Chromosom der Wirtszelle vermehren können, da sie einen eigenen Replikationsursprung (*origin of replication*, ori) besitzen. Plasmide kommen in vielen prokaryontischen Mikroorganismen vor, wobei sie ihren Wirten Überlebensvorteile bieten, wie z.B. den Abbau schwer zugänglicher organischer Verbindungen oder Resistenzen gegenüber Antibiotika oder Schwermetallionen.

Plasmide spielen eine wichtige Rolle als Werkzeuge der Gentechnologie, da sie als Vektoren für die Klonierung, Vermehrung und Expression beliebiger DNA-Stücke eingesetzt werden können. Neben Plasmiden werden heute häufig Cosmide (von Bakteriophagen abgeleitet) und BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*, von Plasmiden abgeleitet) eingesetzt, wenn es um die Klonierung größerer genomischer Abschnitte geht.

(C. Mühlhardt, 2003)

4.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA mittels „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von QIAGEN

Diese Methode zur Minipräparation von Plasmid-DNA beruht auf dem Einsatz einer Silika-Matrix in Membran-Format zur selektiven Bindung von Nukleinsäuren. Die mit dieser Silika-Membran ausgestatteten Zentrifugationssäulchen gewährleisten im Vergleich zu anderen Silika-Formulierungen wie etwa Glasmilch oder eine Silikasuspension, eine wesentlich höhere Reproduzierbarkeit. Der Einsatz toxischer organischer Substanzen wie etwa Phenol entfällt.

(QIAprep® Miniprep Handbook, Qiagen)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- gekühlter Resuspendierungspuffer P1 mit RNase A [Endkonzentration $_{RNase A}$: 100 µg/mL]
- alkalischer NaOH/SDS-Lysepuffer P2
- Hochsalz-Neutralisierungspuffer N3
(Dieser Puffer enthält ein chaotropes Salz in einer Konzentration, welche die Adsorption von Nukleinsäuren an die Silika-Matrix gewährleistet.)
- Waschpuffer PB
- Waschpuffer PE (mit Ethanol)
- Zentrifugations-Säulchen mit Silika-Membran
- Sammelröhrchen
- steriles Wasser (Firma Braun)
- autoklavierte 1.5 mL-Eppendorftubes

Vorgehensweise:

- Zentrifugation der 4 mL *E. coli*-Über-Nacht-Kultur: 10 min
RT
836 g
- Bakterienpellet in 250 µL kaltem P1-Puffer resuspendieren und in 1.5 mL-Eppendorftube überführen
- alkalische Lyse:
Zugabe von 250 µL Lysepuffer P2
Gefäß 4-6 mal invertieren
WICHTIG: 1) NICHT vortexen, da dabei die Gefahr besteht, genomische DNA zu scheren
2) NICHT länger als 5 min lysieren
- Neutralisierung:
Zugaben von 350 µL N3-Puffer
SOFORT 4-6 mal invertieren
- Klärung des Lysats:
Zentrifugation: 10 min
RT
16 060 g
- Bindung der Plasmid-DNA an die Silika-Membran unter Hochsalz-Bedingungen:
Überführung des DNA-haltigen Überstandes in Silikasäulchen, welches in einem Sammelröhrchen steht
- Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
- Durchlauf verwerfen
Silikasäulchen in Sammelröhrchen zurückstellen
- OPTIONAL:
(bei Verwendung von Bakterienstämmen mit hoher Nuklease-Aktivität zur vollständigen Entfernung der Nukleasen)
Zugabe von 500 µL PB-Waschpuffer
- Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
- Waschen:
Zugabe von 750 µL PE-Waschpuffer
- Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
- Durchlauf verwerfen
Silikasäulchen in Sammelröhrchen zurückstellen
- Entfernung von Waschpuffer-Resten:
(Ethanol-Reste aus diesem Puffer können nachfolgende enzymatische Reaktionen negativ beeinflussen)
Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
- Sammelröhrchen verwerfen
Silikasäulchen in 1.5 mL-Eppendorftube stellen

- Elution der DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen:
50 µL steriles Wasser in die Mitte der Membran pipettieren
Inkubation: ca. 1 min
RT
- Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
- Silikasäulchen werfen
Das Eluat im 1.5 mL-Eppendorftube enthält die gereinigte Plasmid-DNA.

4.1.2 Midipräparation von Plasmid-DNA mittels „Plasmid Midi Kit“ von QIAGEN

Dieses Protokoll zur Midipräparation von Plasmid-DNA basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse mit nachfolgender Bindung der Plasmid-DNA an ein Anionen-Tauscher-Harz unter Niedrigsalz-Bedingungen und entsprechendem pH-Wert.

Verunreinigungen wie etwa RNA, Proteine und sonstige Verunreinigungen mit niedrigem Molekulargewicht werden durch einen Waschschrift bei mittlerer Salzkonzentration entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt unter Hochsalz-Bedingungen. Durch Isopropanol-Präzipitation wird die eluierte Plasmid-DNA entsalzt und aufkonzentriert.

Einer der Vorteile dieses Kits besteht darin, dass auf toxische Reagenzien wie Phenol verzichtet werden kann. Darüber hinaus ist die Handhabung sehr einfach, da diese Säulen so konzipiert sind, dass die Lösungen einfach durch die Säulen tropfen und aufgefangen werden können.

(QIAGEN® Plasmid Purification Handbook, 2. Auflage, Qiagen)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- gekühlter Resuspendierungspuffer P1 mit RNase A [Endkonzentration $_{RNase A}$: 100 µg/mL]
- alkalischer NaOH/SDS-Lysepuffer P2
- gekühlter Präzipitierungspuffer P3
(Gekühlter Puffer verstärkt die Präzipitierung.)
- Equilibrierungspuffer QBT
- Waschpuffer QC
- Elutionspuffer QF
- raumtemperiertes 100 % Isopropanol
- raumtemperiertes 70 % Ethanol

Herstellung von 70 % Ethanol: 100% Ethanol 70 mL/100 mL destilliertes Wasser

- QIAGEN-Säule 100
- Faltenfilter
- steriles Wasser (Firma Braun)
- sterile 14 mL-Rundbodenröhrchen
- autoklavierte 1.5 mL-Eppendorftubes

Vorgehensweise:

- Zentrifugation der 50 mL *E. coli*-Über-Nacht-Kultur: 10 min
4°C
3 345 g
- Überstand verwerfen
- Bakterienpellet in 5 mL kaltem P1-Puffer resuspendieren
- alkalische Lyse:
Zugabe von 5 mL Lysepuffer P2
Gefäß 4-6 mal invertieren
Inkubation: 5 min
RT
- **WICHTIG:** 1) NICHT Vortexen, da dabei die Gefahr besteht, genomische DNA zu scheren
2) NICHT länger als 5 min lysieren
- Präzipitation:
Zugabe von 5 mL kaltem Präzipitierungspuffer P3
Gefäß **SOFORT** 4-6 mal invertieren
Inkubation: 20 min
auf Eis
- Zentrifugation: 1 h
4°C
3 345 g
- Equilibrierung der QIAGEN-Säule 100 während der Zentrifugation:
Zugabe von 5 mL QBT-Puffer auf QIAGEN-Säule 100
- Bindung der DNA an Anionen-TauscherHarz unter Niedrigsalz-Bedingungen:
Überstand über Faltenfilter auf equilibrierte QIAGEN-Säule 100 geben
- Durchlauf verwerfen
- 2-maliges Waschen:
Zugabe von je 10 mL QC-Puffer
- Elution der DNA unter Hochsalz-Bedingungen:
Zugabe von 5 mL Puffer QF
Eluat in 14 mL-Rundbodenröhrchen auffangen
- Entsalzen und Aufkonzentrierung der DNA:
Zugabe von 3.5 mL raumtemperiertem 100 % Isopropanol
- Zentrifugation: 1 h
4°C
3 345 g
- Überstand verwerfen
- Waschen des DNA-Pellets:
Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 70 % Ethanol
Pellet resuspendieren
- Zentrifugation: 1 h
4°C
3 345 g
- Überstand verwerfen
- DNA an der Luft trocknen lassen
- getrocknetes DNA-Pellet in entsprechendem Vol sterilem Wasser (200-700 µL) aufnehmen.

4.1.3 Roboterpräparation von Plasmid-DNA im 96-well-Platten-Maßstab mittels „QIAwell 8 Ultra Plasmid Kit“ von QIAGEN

Dieses Protokoll zur Präparation von Plasmid-DNA im 96-*well*-Maßstab basiert auf Bindung der Plasmid-DNA an ein Anionen-Tauscher-Harz. Zur anschließenden Entsalzung und Aufkonzentration wird die Plasmid-DNA an eine Silikagel-Membran gebunden.

Das *QIAwell*-System setzt sich aus 3 einzelnen 96-well-Modulen zusammen: einer Filterplatte, einer DNA-Adsorptionsplatte und einer DNA-Entsalzungsplatte.

Der ganze Ablauf lässt sich in 3 Schritten zusammenfassen:

- 1) Klärung des Lysates über die Filterplatte
- 2) Bindung der DNA an das Anionen-Tauscher-Harz und Befreiung von Verunreinigungen (z.B. RNA, Proteine)
- 3) Entsalzung und Aufkonzentrierung der DNA

Der Vorteil dieser Präparation besteht darin, dass auf Phenol, Chloroform, Polyethylenglykol und Alkohol-Präzipitation verzichtet werden kann.

(QIAwell® System Handbook, Qiagen)

Der ganze Prozess läuft automatisiert an einem Roboter ab (BioRobot® 9600).

benötigte Materialien und Reagenzien:

- gekühlter Resuspendierungspuffer P1 mit RNase A [Endkonzentration $_{RNase\ A}$: 100 µg/mL]
- alkalischer NaOH/SDS-Lysepuffer P2
- Neutralisierungspuffer P3
- Waschpuffer QW
- Waschpuffer PE mit Ethanol
- für die Elution von *QIAwell*TM 96-Platte: Wasch- und Elutionspuffer QE
- für die Elution von *QIAprep*TM 96-Platte: Elutionspuffer EB
- *QIAfilter*TM 96-Platte
- *QIAwell*TM 96-Platte
- *QIAprep*TM 96-Platte
- *microtube rack*
- 96-U-*well*-Platte

Programmablauf:

- Zentrifugation des 96-*Deep-Well*-Blocks (je 1.4 mL *E. coli*-Über-Nacht-Kultur pro *well*):
15 min
4°C
2 772 g
- Überstand verwerfen
- Roboter BioRobot® 9600 vorbereiten:
 - Systemreservoir mit destilliertem Wasser füllen
 - Vacuumfalle leeren
 - Abfallbehälter leeren
 - Kassetten der Peristaltikpumpe schließen

- alle Pufferlösungen an die dafür vorgesehenen Schläuche anschließen
 - alle drei Platten an die dafür vorgesehenen Stellen platzieren
 - *microtube rack* bereitstellen
- 96-Deep-Well-Block mit den Zellpellets an den vorgesehenen Schüttelinkubator-Platz auf dem Roboter platzieren
- Resuspendierung:
Zugabe von 300 µL kaltem Resuspendierungspuffer P1
auf Schüttelplatte: 750 rpm/min
10 min
alle 30 sec Änderung der Schüttelrichtung
- alkalische Lyse:
Zugabe von 300 µL Lysepuffer P2
auf Schüttelplatte: 500 rpm/min
40 sec
600 rpm/min
1 min
- Neutralisierung:
Zugabe von 300 µL Neutralisierungspuffer P3
auf Schüttelplatte: 500 rpm/min
2 min
600 rpm/min
3 min
- Probe überführen auf *QIAfilterTM* 96-Platte
- Klärung des Lysates durch Filtration:
800 mbar
5 min
600 mbar
5 min

Filtrat wird in der darunter befindlichen *QIAwellTM* 96-Platte aufgefangen, in der die Adsorption der DNA aus dem Lysat an das Anionen-Tauscher-Harz erfolgt
- *QIAfilterTM* 96-Platte verwerfen
- Waschen:
800 mbar
3 min
Zugabe von 2x 1 mL QW-Puffer
800 mbar
3 min
- *QIAprepTM* 96 Platte unter die *QIAwellTM* 96-Platte setzen
- Elution in Entsalzungsplatte:
Zugabe von 700 µL Wasch- und Elutionspuffer QE
800 mbar
2 min
- *QIAwellTM* 96-Platte verwerfen
- Waschen:
800 mbar
3 min
Zugabe von 2x 1 mL PE-Puffer
800 mbar
1 min

- Entfernung von Ethanol-Resten:
QIAwellTM 96 Platte aus Roboter herausnehmen, auf 96-U-well-Platte setzen und zentrifugieren
Zentrifugation: 1 min
RT
1 266 g
- QIAwellTM 96 Platte wieder zurück in Roboter stellen
- Elution:
Zugabe von 2x 75 µL Elutionspuffer EB
Inkubation: 1 min
870 mbar
2 min
- Die Eluate im *microtube rack* enthalten die gereinigte Plasmid-DNA.

4.2 Reinigung von PCR-Produkten mittels „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Roche Applied Science

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass in Gegenwart des chaotropen Salzes Guanidinium-Thiocyanat die durch PCR amplifizierte DNA selektiv an spezielle, in den Filtrationsgefäßen vorhandenen Glasfasern bindet. Die gebundene DNA wird durch eine Reihe von schnellen Wasch- und Zentrifugationsschritten von kontaminierenden Primern, nicht eingebauten Nukleotiden, Salzen, evtl. Mineralöl bzw. Wachs und von der thermostabilen Polymerase gereinigt. Die anschließende Elution erfolgt nicht mit Wasser, sondern mit TrisHCl-haltigem Elutionspuffer bei niedriger Salzkonzentration, da ein alkalischer pH-Wert für eine optimale Ausbeute sorgt. Dieses System bietet nicht nur den Vorteil der einfachen Handhabung, sondern vermeidet auch eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, wie z. B. giftigem Phenol, Chloroform, oder Nukleinsäurefällungen (Ethanolpräzipitation).

Die amplifizierte DNA-Produkte eine Größe müssen eine Größe von mindestens 100 bp bis maximal 50 kb haben.

(Nucleic Acid Isolation and Purification Manual, 2. Auflage, Roche Applied Science)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Bindepuffer
- Waschpuffer mit Ethanol
- Elutionspuffer
- *High Pure*-Filtrationsgefäße mit Glasfasern
- Auffanggefäße
- autoklavierte 1.5 mL-Eppendorftubes

Vorgehensweise:

- 100 µL-PCR-Ansatz } gut mischen
+ 500 µL Bindepuffer }

- *High Pure*-Filtrationsgefäß in ein Auffanggefäß setzen
 - Bindepuffer-PCR-Ansatz-Gemisch in *High Pure*-Filtrationsgefäß pipettieren
 - Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
 - Durchlauf verwerfen
 - *High Pure*-Filtrationsgefäß zurück in Auffanggefäß stellen
 - Zugabe von 500 µL Waschpuffer
 - Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
 - Durchlauf verwerfen
 - *High Pure*-Filtrationsgefäß zurück in Auffanggefäß stellen
 - Zugabe von 200 µL Waschpuffer
 - Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
 - Auffanggefäß mit dem Durchlauf verwerfen
 - *High Pure*-Filtrationsgefäß in 1.5mL-Eppendorftube stellen
 - Zugabe von 50 – 100 µL Elutionspuffer
 - Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
 - *High Pure*-Filtrationsgefäß verwerfen
- Das gereinigte PCR-Produkt kann direkt für weitere Anwendungen eingesetzt werden.

4.3 DNA-Quantifizierung mittels Absorptionsspektrometrie

Konzentrationen von DNA- und RNA-Lösungen lassen sich anhand ihrer optischen Dichte (*optical density*, OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmen. Diese Art der Konzentrationsbestimmung ist schnell und einfach.

Für Quantifizierungen werden Verdünnungen mit sterilem Wasser hergestellt und in Präzisions-Quarzglas-Küvetten im Spektrometer vermessen. Als Nullwert dient die optische Dichte von sterilem Wasser ohne Nukleinsäure.

Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor (siehe Gleichung 1).

(C. Mühlhardt, 2003)

$$1OD_{260} = 50\mu g \text{ DNA} / mL$$

$$DNA - \text{Konzentration} [\mu g / \mu L] = \frac{y[OD_{260}] \cdot 50[\mu g]}{1000[\mu L]} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Gleichung 1: Formel zur Berechnung der DNA-Konzentration.

Anmerkung:

Generell macht diese Art der DNA-Vermessung eigentlich nur dann Sinn, wenn man sich sicher ist, nur DNA in der Präparation zu haben.

Die Ergebnisse sollten immer mit Vorsicht genommen werden und nur als Richtwerte dienen, da die Messungen sehr stark von dem pH-Wert und dem Salzgehalt des bei den Messungen verwendeten Wassers abhängen.

(C. Mühlhardt, 2003)

4.4 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme erkennen je nach Spezifität vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Strang. Sie schneiden nur ihre Zielsequenz.

Anhand ihres Aufbaus werden Restriktionsenzyme in drei Kategorien eingeteilt:

Typ I-Restriktionsenzyme bestehen aus drei Untereinheiten (S-, M- und R-Untereinheit.). Die S-Untereinheit erkennt die DNA-Sequenz, die M-Untereinheit methyliert und die R-Untereinheit schneidet. Sie erkennen zwar eine spezifische DNA-Sequenz, schneiden aber zufällig.

Typ III-Restriktionsenzyme bestehen aus mehreren Untereinheiten, erkennen spezifische Sequenzen und schneiden 20-25 Nukleotide entfernt davon. Bisher sind fünf solcher Typ III-Restriktionsenzyme bekannt.

Typ II-Restriktionsenzyme sind die einzigen der Restriktionsenzyme, die DNA an genau definierbaren Stellen schneiden. Typ II-Restriktionsenzyme bestehen aus zwei unabhängigen Proteinen, dem Restriktionsenzym und der Methylase. Beide Proteine erkennen die gleiche Zielsequenz. Dabei schneidet das Restriktionsenzym die DNA, während die Methylase hemimethylierte DNA vollständig methyliert und so vor dem Abbau durch das Restriktionsenzym schützt. Über diesen Mechanismus schützt sich das Bakterium gegen den Abbau seiner DNA durch die eigenen Restriktionsenzyme. Manche Restriktionsenzyme aus verschiedenen Bakterien erkennen zwar die gleiche Sequenz, unterscheiden sich aber aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft in ihrer Methylierungsempfindlichkeit.

Enzyme, die die gleiche Sequenz erkennen und in gleicher Weise schneiden werden als Isoschizomere bezeichnet. Als Neoschizomere werden Restriktionsenzyme bezeichnet, die zwar die gleiche Sequenz erkennen, aber anders schneiden.

Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind meistens Palindrome, d.h. spiegelsymmetrische und damit in beiden Strängen gleiche Sequenzen.

Fast alle Enzyme generieren Fragmente mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Ende, was wichtig für Ligationen ist (siehe 4.5). Die Enden sind entweder glatt (*blunt ends*), d.h. in beiden Strängen wird an der gleichen Stelle geschnitten, oder stehen über (*sticky ends*). Ein solcher Überhang ist meist zwei oder vier Basen lang.

(C. Mühlhardt, 2003)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Restriktionsenzym
- dem Restriktionsenzym zugehöriger 10x Puffer
- je nach Enzym: 100x BSA
- autoklavierte 1.5 mL-Eppendorftubes
- steriles Wasser (Firma Braun)
- zu verdauende DNA

Vorgehensweise:• Ansetzen des Verdaus:X μg zu verdauende DNA [μL]1/10 des Gesamtvolumens des Verdauansatzes an 10x Puffer [μL]1/100 des Gesamtvolumens des Verdauansatzes an 100x BSA [μL] *

Y Units Enzym [U] *

ad Z μL Gesamtvolumen mit sterilem Wasser

* i.d.R. 5 Units Enzym pro 300 ng zu verdauende DNA einsetzen

* Viele Restriktionsenzyme zeigen höhere Aktivität in Gegenwart von BSA.

Herstellerangaben beachten, ob BSA-Zugabe zu Verdau erforderlich oder nicht

- Inkubation: 1 h
37°C

4.5 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase

Unter Ligation versteht man das Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase.

Mit Hilfe der Ligation kann ein fremdes DNA-Fragment in einen geöffneten Plasmid-Ring integriert werden. Der Plasmid-Ring wird über einen Restriktionsverdau (siehe 4.4) geöffnet. Auch das zu inserierende DNA-Fragment wird mit Restriktionsenzymen geschnitten oder über PCR so generiert, dass es Überhänge besitzt, die den Überhängen von Restriktionsverdaus entsprechen. Da Basenpaarung nur zwischen komplementären Sequenzen möglich ist, können von einem Restriktionsenzym erzeugte kohäsive Enden (*sticky ends*) nicht mit denen von einem anderen Enzym erzeugten Enden paaren, es sei denn, dieses andere Enzym erzeugt die gleichen kohäsiven Enden. Dagegen können zwei beliebige, von demselben Enzym erzeugte Fragmente, ungeachtet ihrer unterschiedlichen Herkunft, miteinander ligiert („verklebt“) werden. Am geöffneten Plasmid-Ring aus einem Restriktionsansatz kann sich dann ein fremdes DNA-Fragment mit den entsprechenden komplementären Enden anlagern. DNAs mit über Restriktionsenzymen oder PCR hergestellten komplementären, einzelsträngigen Enden können über diese Überhänge Basenpaarung eingehen und dann über die Ligase fest miteinander verbunden werden.

Das „Verkleben“ erfolgt zuerst durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen, dann erfolgen kovalente Bindungen über das Enzym T4-DNA-Ligase. Dabei kommt es zur Phosphodiesterbindung zwischen der freien 5'-Phosphat-Gruppe und der freien 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose.

Eine Ligation erfolgt im allgemeinen bei etwa 15°C. Bei dieser relativ niedrigen Temperatur wird gewährleistet, dass beide komplementären Enden Basenpaare ausbilden und dass die Ligase noch aktiv ist.

Das Standardenzym für Ligationen ist die T4 DNA-Ligase. Sie ist extrem schnell, geeignet für die Ligation sowohl von *sticky ends* als auch von *blunt ends*, und sie ist genügsam bzgl. Pufferbedingungen. Ligationen funktionieren daher nicht nur im passenden Ligasepuffer, sondern auch in fast jedem Restriktionspuffer, sofern man etwas ATP (Endkonzentration 1-5 mM) zugibt, das bei der Ligation gebraucht wird.

(C. Mühlhardt, 2003)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- geschnittene Vektor-DNA
- zu inserierende DNA
- T4-Ligase (5 U/ μ L)
- 10x T4-Ligase-Puffer
- autoklavierte 1.5 mL-Eppendorftubes
- steriles Wasser (Firma Braun)

Vorgehensweise:

- Ansetzen eines 20 μ L-Ligationsansatzes:
 - 12 μ L steriles Wasser
 - 2 μ L T4-Ligase-Puffer
 - 2 μ L geschnittene Vektor-DNA
 - 2-4 μ L zu inserierende DNA

- 20 μ L Gesamtvolumen
- Inkubation: über Nacht
15°C

4.6 Mung Bean-Reaktion

Die aus den Sprossen der Mungobohne *Vigna radiata* gewonnene Mung Bean Nuklease gehört zu einer Klasse von Enzymen, die eine Präferenz für einzelsträngige Nukleinsäuren (DNA oder RNA) zeigen und diese zu Produkten mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxyl-Ende hydrolysieren. Die Mung Bean Nuklease katalysiert also die Generierung von DNA mit glatten Enden (*blunt ends*), schneidet aber auch Haarnadelschleifen in getrennten cDNA-Strängen, baut aber keine doppelsträngige DNA, doppelsträngige RNA oder DNA/RNA-Hybride ab.

(Datenblatt „Mung Bean Nuclease“ von Promega, Datenblatt „Mung Bean Nuclease“ von Epicentre® Biotechnologies)

Das Enzym wird durch hohe Salzkonzentrationen gehemmt (80-90% Hemmung bei 200 - 400 nM NaCl).

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Phenol-Chloroform-gefällte DNA (siehe 4.7)
- 10x Mung Bean Nuklease-Puffer
- Mung Bean Nuklease (1 U/ μ L)
- autoklavierte 1.5 mL-Eppendorftubes
- steriles Wasser (Firma Braun)

Vorgehensweise:

- Ansetzen eines 30 µL-Reaktionsansatzes:
14 µL steriles Wasser
10 µL gefällte DNA
3 µL 10x Mung Bean Nuklease-Puffer
3 µL Mung Bean Nuklease
-
- 30 µL Gesamtvolumen
- Inkubation: 30 min
30°C
 - Reinigung des Reaktionsansatzes über Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 4.7) für den weiteren Einsatz bei Ligationen etc.

4.7 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Fällung dient der Inaktivierung von Restriktionsenzymen oder zum Entfernen von Proteinen aus einer DNA-haltigen Lösung. Dazu wird die DNA-Lösung mit einem wassergesättigten Phenol/Chloroform-Gemisch durch Schütteln vermischt. Dabei kommt es zum Ausfällen der Proteine, die anschließend in der phenolischen Phase vorliegen. Durch Zentrifugation wird eine Phasentrennung herbeigeführt. Die Nukleinsäuren bleiben aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen wässrigen Phase gelöst, während sich die enthaltenen Proteine zwischen beiden Phasen, in der sog. Interphase, anordnen. Die sich in der oberen, wässrigen Phase befindende DNA wird anschließend mit Isopropanol oder Ethanol-Natriumacetat gefällt.

Obwohl sich die Verschmutzungen in der Interphase ansammeln und dort häufig gut sichtbar sind, ist es meist mühsam, die wässrige Phase, die die DNA enthält, abzapipettieren, ohne diesen Schmutz mitzunehmen. Häufig sind auch die Verluste dabei relativ gross. Zur Verringerung der Verluste und für eine einfachere Handhabung, gibt es mittlerweile Produkte wie *Phase Lock Gel*TM (PLG). Es handelt sich dabei um ein zähes Gel, das bereits in Reaktionsgefäßen verschiedener Größen vorpipettiert ist und das weder mit der phenolischen noch mit der wässrigen Phase reagiert, und nach Zentrifugation eine stabile Schicht zwischen den beiden Phasen bildet, was ein leichtes Abpipettieren ermöglicht und die Ausbeute erhöht. Außerdem wird die Gefahr der Kontamination der Probe durch Interphasenbestandteile reduziert.

(C. Mühlhardt, 2003)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- *Phase Lock Gel*TM Sephadexsäulen
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
- zu reinigende DNA
- autoklavierte 1.5 mL-Eppendorftubes
- raumtemperiertes 100 % Ethanol
- raumtemperiertes 80 % Ethanol

Herstellung von 80 % Ethanol: 100 % Ethanol 80 mL/100 mL destilliertes Wasser

- 1x TE

Herstellung von 100 mL 100x TE: Tris 12,11 g
 EDTA 3,7 g

ad 100 mL destilliertes Wasser
 autoklavieren

Herstellung von 50 mL 1x TE: 1:100-Verdünnung von 100x TE
 5 mL 10x TE
 455 mL destilliertes Wasser

- 3M NatriumAcetat-Lösung (pH 5.2)

Herstellung von 50 mL 3 M NaAc-Lösung: NaAc 12,3 g/50 mL destilliertes Wasser

Vorgehensweise:

- Zentrifugation der *Phase Lock Gel™* Sephadexsäule: 1 min
 RT
 16 060 g
- Zugabe von 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
- Zugabe der Probe
- Schütteln
- Zentrifugation: 2 min
 RT
 16 060 g
- obere Phase in 1.5 mL-Eppendorftube überführen
- Zugabe von: 0.5 Vol 3 M NaAc (pH 5.2)
 2.5 Vol 100 % Ethanol
- Zentrifugation: 10 min
 RT
 16 060 g
- Überstand verwerfen
- Zugabe von 80 % Ethanol
- Zentrifugation: 10 min
 RT
 16 060 g
- Überstand verwerfen
- Pellet luft-trocknen lassen
- Pellet in 10 µL 1x TE aufnehmen

4.8 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Bakterienzellen sind nur dann in der Lage, DNA aus Medium aufzunehmen, wenn ein definierter physiologischer Zustand vorliegt. Dieser physiologische Zustand wird als Kompetenz bezeichnet.

Die Induktion der Kompetenz erfolgt bei gram-positiven und gram-negativen Zellen unterschiedlich. So können gram-positive Bakterien Kompetenz nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen und bei einer ausreichenden Menge an freigesetzten sog.

Kompetenzfaktoren (= relativ kleine Polypeptide mit ca. 5-10 kDa) ausbilden. Bei gram-negativen Bakterien ist die Kompetenz dagegen weder von Kompetenzfaktoren abhängig, noch wird sie von externen Proteasen beeinflusst. Kompetenz wird bei ihnen durch Nährstoffmangel oder durch Blockade der Zellteilung bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Proteinsynthese erreicht. Dabei werden eine Reihe spezifischer Proteine der inneren und äußeren Membran induziert. Es gibt aber auch Bakterien wie z.B. die gram-negativen *Escherichia coli*, die anscheinend keine Eigenschaften für eine solche spontane Transformation entwickelt haben.

(W. Seyffert *et al.*, 1998)

4.8.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen mittels Kalziumchlorid-Methode

Seit 1970 ist bekannt, dass hohe Konzentrationen an Ca^{2+} -Ionen eine artifizielle Transformation ermöglichen. Reusch *et al.* (1986) nehmen an, dass Kalzium die *de-novo*-Synthese und den Einbau von Poly- β -Hydroxybutyrat in die Zytoplasmamembran stimuliert und damit eine Veränderung der Lipidstruktur der Membran verursacht. Diese Veränderung in der Membranlipidstruktur wäre somit verantwortlich für die Kompetenz.

(W. Seyffert *et al.*, 1998)

benötigte Materialien und Reagenzien für die Vorkultur:

- steriler 100 mL-Glaskolben
- 30 μL Bakterien-Stock
- autoklaviertes **Luria-Bertani-Medium**

Herstellung von LB-Medium: LB Broth 20 g/L destilliertes Wasser

benötigte Materialien und Reagenzien zur Herstellung der chemisch kompetenten Zellen:

- sterile 2 L-Glaskolben
- sterile Reaktionsgefäße (PCR-*Stripes*)
- vorgekühlte Zentrifugenbecher à 250 mL
- vorgekühlte 50 mL-Greiner-Röhrchen
- autoklaviertes **Luria-Bertani-Medium**

Herstellung von LB-Medium: LB Broth 20 g/L destilliertes Wasser

- gekühlte, autoklavierte 100 mM CaCl_2 -Lösung mit 15 % Glycerin

Herstellung von 100 mM CaCl_2 mit 15 % Glycerin:

86 % Glycerin	171 mL
CaCl_2	14,7 g

ad 1 L destilliertes Wasser

- gekühlte, autoklavierte 100 mM CaCl_2 -Lösung

Herstellung von 100 mM CaCl_2 : CaCl_2 14,7 g/L destilliertes Wasser

Vorgehensweise:

- am Vorabend stationäre *E. coli*-Über-Nacht-Vorkultur animpfen:
50 mL LB-Medium
30 µL Bakterien-Stock
- Inkubation: über Nacht
37°C-Schüttelinkubator
250 rpm
- Medium mit *E. coli*-Über-Nacht-Vorkultur animpfen:
500 mL LB-Medium
5 mL stationäre *E. coli*-Über-Nacht-Kultur
Inkubation: bis OD₆₀₀ ~ 0,3-0,4
37°C-Schüttelinkubator
250 rpm
- Überführung der Bakterienkultur in 2 vorgekühlte Zentrifugenbecher à 250 mL
- Zentrifugation: 10 min
4°C
2 709 g
- Überstand verwerfen
Bakterienpellets mit 25 mL gekühlter 100 mM CaCl₂ je Becher resuspendieren
- resuspendierte Zellen in vorgekühlte Zentrifugen-Röhrchen oder 50 mL-Greiner-Röhrchen überführen
- Inkubation: 30 min
auf Eis
- Zentrifugation: 10 min
4°C
2 709 g
- Überstand verwerfen
Zellpellets mit 2.5 mL gekühlter CaCl₂-Glycerin-Lösung je Röhrchen resuspendieren
- aliquotieren à 100 µL in vorgekühlte PCR-Stripes
- SOFORT in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Lagerung bei -80°C

4.8.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen nach Angaben von BioRad

benötigte Materialien und Reagenzien für die Vorkultur:

- steriler 100 mL-Glaskolben
- 30 µL Bakterien-Stock
- autoklaviertes SOB⁻-Medium

<u>Herstellung von SOB⁻-Medium:</u>	Trypton	20 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	0,584 g
	KCl	0,186 g

ad 1 L destilliertes Wasser

benötigte Materialien und Reagenzien zur Herstellung der elektrokompetenten Zellen:

- sterile 2 L-Glaskolben
- autoklavierte Reaktionsgefäße (PCR-*Stripes*)
- vorgekühlte Zentrifugenbecher à 250 mL
- vorgekühlte Zentrifugen-Röhrchen à 30 mL
- autoklaviertes SOB⁻-Medium

<u>Herstellung von SOB⁻-Medium:</u>	Trypton	20 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	0,584 g
	KCl	0,186 g
	ad 1 L destilliertes Wasser	

- gekühlte, autoklavierte 10 % Glycerin-Lösung
- raumtemperierte, autoklavierte 10 % Glycerin-Lösung

Herstellung von 10 % Glycerin: 86 % Glycerin 164 mL/L destilliertes Wasser

Vorgehensweise:

- am Vorabend stationäre *E. coli*-Über-Nacht-Vorkultur animpfen:
50 mL SOB⁻-Medium
30 µL Bakterien-Stock
- Inkubation: über Nacht
37°C-Schüttelinkubator
230 rpm
- Medium mit stationärer *E. coli*-Über-Nacht-Vorkultur animpfen:
1 L SOB⁻-Medium
1 mL der *E. coli*-Über-Nacht-Vorkultur
- Inkubation: bis OD₆₀₀ ~0,6 – 0,8
37°C-Schüttelinkubator
250 rpm
- Überführung der Bakterienkultur in 4 vorgekühlte Zentrifugenbecher à 250 mL
- Zentrifugation: 10 min
4°C
2 772 g
- Überstand verwerfen
- 2-maliges Waschen der Zellpellets:
Zellpellet in je 250 mL gekühltem 10 % Glycerin resuspendieren
Zentrifugation: 15 min
4°C
2 772 g
Überstand verwerfen
- Zellen in je 10–15 mL raumtemperiertem 10 % Glycerin aufnehmen und in 4 vorgekühlte Zentrifugen- oder 50 mL-Greiner-Röhrchen überführen
- Zentrifugation: 20 min
RT
2 272 g
- Überstand nicht vollständig verwerfen, SONDERN mit etwa 1–2 mL des Überstandes die Zellen resuspendieren

- aliquotieren à 100 µL in vorgekühlte PCR-*Stripes*
- SOFORT in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Lagerung bei -80°C

4.8.3 Testen der Kompetenz kompetenter Zellen

Die Kompetenz einer Charge Bakterien wird immer in Anzahl Kolonien je µg DNA angegeben. In der Regel verwendet man für den Test eine „Standard“-Vektor-DNA wie pBR322 (4361 bp) oder pUC19 (2686 bp), was Vergleiche zwischen verschiedenen Labors erlaubt.

Für den Kompetenz-Test wird nur eine kleine DNA-Menge mit niedriger Konzentration eingesetzt, um zum einen die Kolonienzahl auszählbar zu halten und zum anderen, weil bei zuviel DNA im Transformationsansatz die Ausbeute auch wieder sinkt. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die Transformationseffizienz für große DNA-Stücke (>10 kb) schlechter ist als für kleine. Auch Ligationsansätze lassen sich schlechter transformieren als gereinigte Plasmid-DNA.

Im allgemeinen erwartet man eine Kompetenz von 10^7 Kolonien/µg DNA; dabei entsprechen 10 pg DNA etwa 100 Kolonien und damit einer Anzahl, die sich auf einer Petrischale noch gut auszählen lässt.

Wenn man die Bakterien einfrieren und lagern möchte, führt man den Test besser an einem tiefgefrorenen Aliquot durch, weil die Kompetenz frischer Bakterien etwa um den Faktor 10 höher ist.

(C. Mühlhardt, 2003)

4.9 Transformation in kompetente Bakterien

Als Transformation wird die Genübertragung ohne jeglichen Zellkontakt durch freie DNA bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine permanente, erbliche Veränderung in einer Zelle, die aus der Aufnahme und Inkorporation einer Fremd-DNA resultiert.

(W. Buselmeier, 1997)

4.9.1 Transformation in chemisch kompetente Bakterien

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Luria-Bertani-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika

<u>Herstellung von LB-Agarplatten:</u>	LB Broth	20 g
	Agar	15 g
<hr/>		
	ad 1 L destilliertes Wasser	
	Antibiotika	Zugabe NACH Autoklavieren, da die Antibiotika hitzelabil sind

Herstellung der verschiedenen Antibiotika-Lösungen und ihre einzusetzenden Konzentrationen:
(siehe 3.10)

- chemisch kompetente Bakterien

- autoklaviertes **Luria-Bertani-Medium**

Herstellung von LB-Medium: LB Broth 20 g/L destilliertes Wasser

- Plasmid-DNA, LR- oder Ligationsansatz
- autoklavierte 1.5mL-Eppendorftubes

Vorgehensweise:

- Ansetzen eines Transformations-Ansatzes:
50 µL chemisch kompetente Zellen }
5 µL DNA, LR- oder Ligationsansatz } mischen
- Inkubation: 30 min
 auf Eis
- Hitzeschock: 2 min
 42°C-Thermomixer
 550 rpm
- Zugabe von 450 µL vorgewärmtem LB-Medium
- Inkubation: 1 h
 37°C-Thermomixer
 550 rpm
- 100 µL Transformationsansatz auf Agarplatte ausplattieren
- Inkubation der LB-Antibiotika-Agarplatte: über Nacht
 37°C-Brutschrank

4.9.2 Transformation in elektro-kompetenter Bakterien

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode zum Transfer von DNA in gram-negative und gram-positive Bakterienzellen. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass kurze, elektrische Impulse hoher Feldstärke Löcher in der Zellwand verursachen, die sich sofort wieder schließen. Durch diese Öffnungen kann Fremd-DNA in Bakterien-, Pflanzen- und sogar Säugetierzellen eingeführt werden. Mit der Elektroporation können hohe Transformationsraten erzielt werden.

Die zu transformierende DNA muss sich zur Vermeidung eines elektrischen Durchschlags in einer weitgehend ionenfreien Lösung befinden. Bei gram-positiven Bakterien kann man die Transformationseffizienz bei der Elektroporation noch erhöhen, indem man bei der Anzucht der Zellen Substanzen zusetzt, die den Zellwandaufbau schwächen (z.B. Tween 80, Isonikotinsäurehydrazid). Diese Zellen müssen dann in der früh-logarithmischen Phase geerntet und für die Elektroporation aufbereitet werden.

(C. Mühlhardt, 2003)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Plasmid-DNA oder LR- bzw. Ligationsansatz
- Elektroporationsküvetten
- autoklavierte 1.5mL-Eppendorftubes
- *Gene PulserTM II*-Gerät inklusive *Pulse Controler*

- **Luria-Bertani-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika**

<u>Herstellung von LB-Agarplatten:</u>	LB Broth	20 g
	Agar	15 g
<hr/>		
	ad 1 L destilliertes Wasser	
	Antibiotika	Zugabe NACH Autoklavieren, da die Antibiotika hitzelabel sind

Herstellung der verschiedenen Antibiotika-Lösungen und ihre einzusetzenden Konzentrationen:
(siehe 3.10)elektro-kompetente Bakterien

- autoklaviertes **Luria-Bertani-Medium**

Herstellung von LB-Medium: LB Broth 20 g/L destilliertes Wasser

Vorgehensweise:

- Ansetzen eines Transformations-Ansatzes in 1.5 mL-Eppendorftube:
 30 µL elektrokompetente Zellen
 1 µL DNA, LR- oder Ligationsansatz } mischen

in 1.5 mL-Eppendorftube vorlegen: 1 mL LB-Medium

- Zell-DNA-Mix in Elektroporationsküvette geben
- Elektroporation: 25 µF
1,68 kV
200 Ω
- Anmerkung: Die Zeitkonstante sollte nach dem Pulsen bei 4,5 – 5,0 liegen
- Das in 1.5 mL-Eppendorftube vorgelegte LB-Medium zum gepulsten Zell-DNA-Mix in die Elektroporationsküvette dazugeben, mischen und den Ansatz in 1.5 mL-Eppendorftube pipettieren
- Inkubation: 1 h
37°C-Thermomixer
550 rpm
- 100 µL Transformationsansatz auf Agarplatte ausplattieren
- Inkubation der LB-Antibiotika-Agarplatte: über Nacht
37°C-Brutschrank

4.10 GATEWAYTM Cloning Technology

Die GATEWAYTM Cloning Technology erlaubt einen einfachen, schnellen Transfer von DNA-Segmenten (genomische DNA, Gene oder PCR-Produkte) zwischen verschiedenen Klonierungsvektoren, ohne Einsatz von Restriktionsendonukleasen und Ligase. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Orientierung und Leserahmen erhalten bleiben.

Das GATEWAYTM-System basiert auf zwei Reaktionen des positions-spezifischen Rekombinationssystems des Bakteriophagen Lamda: der sog. BP Reaktion und der sog. LR Reaktion. Ein Cocktail aus Rekombinationsproteinen des Bakteriophagen Lambda und dem von *Escherichia coli* kodierten *Integration Host Factor* (IHF) vermittelt diese Reaktionen (siehe Abbildung 8).

Nach Infektion einer *E. coli*-Zelle durch Lambda-Phagen gibt es, abhängig vom Zustand der Zelle, zwei Möglichkeiten des Infektionsverlaufs:

Der Bakteriophage kann als lytischer Phage wachsen, oder er kann als Prophage in das Genom von *E. coli* integrieren, und zwar durch einen Prozeß, der als Lysogenie bezeichnet wird. Diesen Prozeß hat man sich bei der *GATEWAYTM Cloning Technology* zunutze gemacht. Eine lysogen gewordene Bakterienzelle bleibt lebensfähig und wird immun gegen eine weitere Infektion. Einmal integriert, bleibt der Bakteriophage Lambda Teil des *E. coli*-Chromosoms, bis er wieder herausgeschnitten wird. Bei der Lysogenie handelt es sich um einen positions-spezifischen Vorgang, bei dem die *attP*-Stellen des Bakteriophagen Lambda mit den *attB*-Stellen im *E. coli*-Genom rekombinieren. Katalysiert wird die Lysogenie, die auch als Integration bezeichnet wird, von dem vom Lambda-Phagen kodierten Protein **I**ntegrase (Int) und dem *E. coli*-Protein Integration Host Factor. Bei der Integration werden durch die Rekombination zwischen den *attB*- und *attP*-Stellen neue Klonierungsstellen, die *attL*- und *attR*-Stellen, generiert, die die integrierte Lambda-DNA flankieren. Die bei der Lysogenie ablaufenden Reaktionen finden *in vitro* bei der *GATEWAYTM BP* Reaktion statt.

Der Vorgang des Wiederherausschneidens der Lambda-DNA aus dem *E. coli*-Chromosom wird von dem Integration Host Factor zusammen mit den beiden Lambda-Phagen-Proteinen Integrase und **E**xisionase (Xis) katalysiert. Die *attL*- und *attR*-Stellen, die die integrierte Phagen-DNA flankieren, rekombinieren während des Wiederausschneidens positions-spezifisch und die *attP*-Stellen im Phagen und die *attB*-Stellen im *E. coli*-Chromosom werden wieder generiert. Die Reaktionen bei diesem Wiederherausschneiden werden bei der *GATEWAYTM LR* Reaktion eingesetzt.

(Anleitungshandbuch „*GATEWAYTM Cloning Technology*“; www.invitrogen.com)

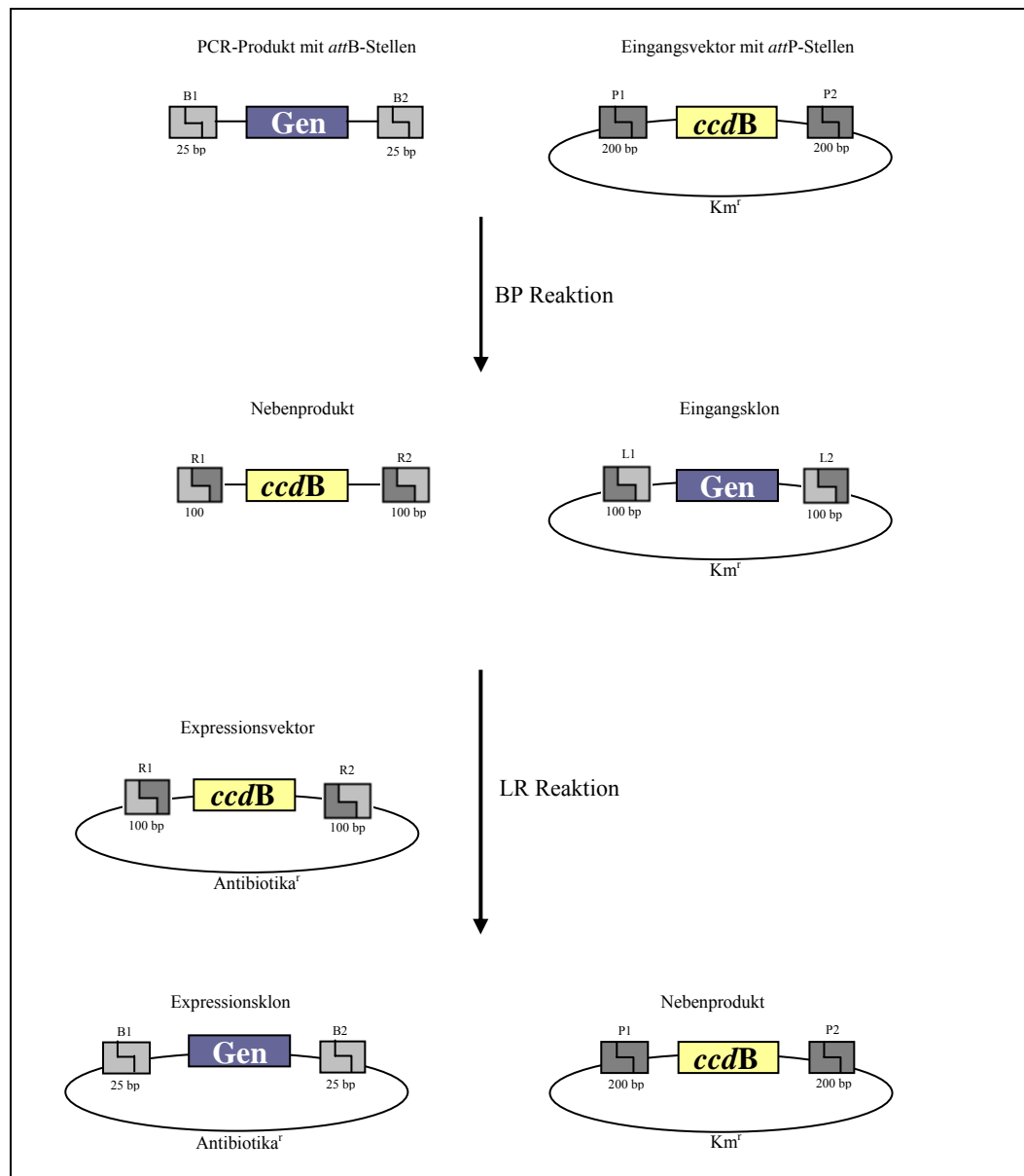


Abbildung 8: GATEWAY™ Cloning Technology.

Über eine 2-Schritt-PCR werden an die gewünschte DNA-Sequenz attB-Rekombinationsstellen angehängt. Diese attB-Stellen sind für die BP-Reaktion nötig. Der Vektor, in den die Wunschsequenz inseriert werden soll, enthält als Gegenstücke die attP-Rekombinationsstellen. Diese flankieren das ccdB-Gen. Als zusätzlicher Selektionsmarker fungiert die Kanamycinresistenz. Die Enzymmischung der BP Clonase™ ermöglicht die homologe Rekombination zwischen den att-Rekombinationsstellen. Das Ergebnis sind zwei verschiedene Moleküle mit neuen Rekombinationsstellen: der sog. Eingangsklon enthält das gewünschte DNA-Segment, welches nun von attL-Rekombinationsstellen flankiert wird, das Nebenprodukt enthält das giftige ccdB-Gen, das von attR-Rekombinationsstellen abgegrenzt wird. Bakterien, die dieses ccdB-haltige Segment aufgenommen haben, sterben. Der Eingangsklon wird für den Transfer der Wunschsequenz in verschiedene Expressionsvektoren benutzt, sofern diese attR-Rekombinationsstellen besitzen, die wieder das ccdB-Gen flankieren. Die Enzyme im LR Clonase™-Mix katalysieren die homologe Rekombination zwischen den attL- und attR-Stellen. Es entsteht der gewünschte Expressionsklon mit neuem Vektorrückgrat, in dem die Wunschsequenz von den attP-Rekombinationsstellen flankiert wird, und wieder ein Nebenprodukt, mit attB-Rekombinationsstellen, die das ccdB-Gen flankieren.

Anleitungshandbuch „GATEWAY™ Cloning Technology“ (modifiziert)

4.10.1 GATEWAY™ BP-Reaktion

Die *attB* x *attP* Reaktion wird vom *GATEWAY™ BP Clonase*-Enzymmix vermittelt. Dieser Enzymmix ist eine geschützte Enzym-Formulierung, die das Rekombinationsprotein **I**ntegrase (Int) des Bakteriophagen Lambda und das von *Escherichia coli* kodierte Protein **I**ntegration **H**ost **F**aktor (IHF) enthält. Über diesen Enzymmix wird eine DNA-Sequenz, die die terminalen *attB*1- und *attB*2-Stellen besitzt, direkt in einen Eingangsvektor kloniert, der *attP*-Stellen und Selektionsmarker (Antibiotikaresistenz, *ccdB*-Gen) besitzt. Der resultierende Eingangsklon enthält das gewünschte DNA-Segment, das nun von *attL*1- und *attL*2-Stellen flankiert wird. Eine Negativselektion gegenüber dem bei der Rekombination ebenfalls entstehenden Nebenprodukt wird über das toxische *ccdB*-Gen erreicht. Das von diesem Gen kodierte Protein ist ein Zellgift, das die bakterielle DNA-Gyrase (Topoisomerase II) vergiftet und somit für die meisten *E. coli*-Stämme toxisch ist. Solche Eingangsklone werden dazu benutzt, um über die sog. *GATEWAY™ LR* Reaktion (siehe 4.10.2) die gewünschten DNA-Segmente in verschiedene Expressionsvektoren transferieren. (Anleitungshandbuch „*GATEWAY™ Cloning Technology*“; www.invitrogen.com)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- *GATEWAY™ BP*-Reaktionspuffer
- *GATEWAY™ BP Clonase™*-Enzymmix
- Eingangsvektor pDONR201 (Stockkonzentration: 150 ng/μL)
- PCR-Produkt mit *attB*-Stellen
- steriles Wasser (Firma Braun)
- autoklavierte Reaktionsgefäße (1.5 mL-Eppendorftubes, PCR-Stripes)
- Proteinase K (2 μg/μL)

Vorgehensweise:

- Reaktionsansatz pipettieren:

PCR-Produkt mit <i>attB</i> -Stellen	5 μL
steriles Wasser	1 μL
<i>GATEWAY™ BP</i> -Reaktionspuffer	2 μL
pDONR201 (Stockkonzentration: 150 ng/μl)	1 μL
<i>GATEWAY™ BP Clonase™</i> -Enzymmix	1 μL

10 μL Gesamtvolumen

- Inkubation: 20 h
25°C
- Abstoppen der Reaktion:
Zugabe von 1 μL Proteinase K
Inkubation: 10 min
37°C
10 min
65°C
- abgestoppeter Reaktionsansatz möglichst sofort transformieren, ansonsten Lagerung bei -20°C

4.10.2 GATEWAY™ LR-Reaktion

Die *attL* x *attR* Reaktion wird vom *GATEWAY™ LR Clonase*-Enzymmix vermittelt. Dieser Enzym-Mix ist eine geschützte Enzym-Formulierung, die die Proteine **I**ntegrase (Int) und **E**xisionase (Xis) des Bakteriophagen Lambda und das von *Escherichia coli* kodierte Protein **I**ntegration **H**ost **F**aktor (IHF) enthält.

Mit Hilfe dieses Enzymmixes wird das DNA-Segment aus dem Eingangsklon in verschiedene *GATEWAY™*-Expressionsvektoren transferiert. Voraussetzung ist auch hier wieder das Vorhandensein bestimmter Rekombinationsstellen. Bei den Rekombinationsstellen in einem *GATEWAY™*-Expressionsvektor handelt es sich um die *attR1*- und *attR2*-Stellen, die das *ccdB*-Gen flankieren. Auch hier entsteht neben dem gewünschten Expressionsklon (DNA-Segment wird nun von *attB1*- und *attB2*-Stellen flankiert), ein Nebenprodukt, das die von *attP1*- und *attP2*-Stellen flankierte Sequenz für das toxische *ccdB*-Gen enthält.

(Anleitungshandbuch „*GATEWAY™ Cloning Technology*“; www.invitrogen.com)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- *GATEWAY™ LR*-Reaktionspuffer
- *GATEWAY™ LR Clonase™*-Enzymmix
- Eingangsklon (Stockkonzentration: 100 ng/μL)
- Expressionsvektor (Stockkonzentration: 150 ng/μL)
- steriles Wasser (Firma Braun)
- autoklavierte Reaktionsgefäße (1,5 mL-Eppendorftubes, *PCR-Stripes*)
- Proteinase K (2 μg/μL)

Vorgehensweise:

- Reaktionsansatz pipettieren:

steriles Wasser	5 μL
<i>GATEWAY™ LR</i> -Reaktionspuffer	2 μL
Expressionsvektor (Stockkonzentration: 150 ng/μl)	1 μL
Eingangsklon (Stockkonzentration: 100 ng/μl)	1 μL
<i>GATEWAY™ LR Clonase™</i> -Enzymmix	1 μL

10 μL Gesamtvolumen

- Inkubation: 20 h
2h°C
- Abstoppen der Reaktion:
Zugabe von 1 μL Proteinase K
Inkubation: 10 min
37°C
- abgestoppter Reaktionsansatz möglichst sofort transformieren,
ansonsten Lagerung bei -20°C

4.11 Agarosegel-Elektrophorese

Nukleinsäuren enthalten geladene oder ionisierbare Gruppen. Aufgrund dieser Ladung können sie in einem elektrischen Feld gerichtet bewegt werden: positiv geladene Moleküle wandern zur negativ geladenen Katode, negativ geladene Moleküle wandern zur positiv geladenen Anode.

Als Trägermatrix wird in der Praxis meist ein Gel verwendet. Durch die Wahl der gelbildenden Substanzen, wie Polyacrylamid, Stärke oder Agarose (siehe Abbildung 9) und der physikalischen Eigenschaften (Porengröße, Vernetzungsgrad) wird ein sog. „Molekularsieb-Effekt“ erreicht, mit dem Ergebnis, dass Moleküle bei gleicher Ladung aufgrund ihrer Größe separiert werden. Der effektive Trennungsbereich wird durch die Agarose-Konzentration über die Poren-Größe des dreidimensionalen, auspolymerisierten Netzwerkes bestimmt (siehe Tabelle 2).

(Sambrook *et al.*, 1989)

Agarose-Konzentration im Gel [% w/v]	Auftrennungsbereich linearer DNA-Fragmente [kb]
0.5	1 – 30
0.7	0.8 – 12
1.0	0.5 – 7
1.2	0.4 – 6
1.5	0.2 – 3
2.0	0.1 – 2

Tabelle 2: Agarose-Konzentrationen für die Auftrennung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten.

C. Mühlhardt, „Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics“ (2003)

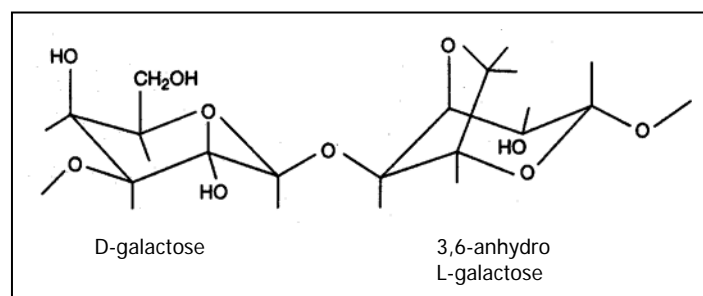


Abbildung 9: Chemische Struktur von Agarose.

Agarose ist ein aus Seetang extrahiertes, lineares Polysaccharid, das aus alternierenden Resten von D- und L-Galactose besteht, die über α -(1 \rightarrow 3) und β -(1 \rightarrow 4) glykosidische Bindungen miteinander verbunden sind (...D-galactose/3,6-anhydro-L-galactose...). Kommerziell hergestellte Agarose-Polymere bestehen aus ungefähr 800 Galactose-Resten. Die Agarose wird durch Aufkochen in Pufferlösung geschmolzen und in Gelformen gegossen (mit Aussparungen für die Geltaschen, in die später die Proben gefüllt werden) und bis zum Erstarren bei Zimmertemperatur abgekühlt. Dabei bildet sich eine homogene Gelmatrix.

Sambrook *et al.*, „Molecular Cloning“ (1989)

Die beiden häufigsten verwendeten Puffer bei der Agarosegel-Elektrophorese sind: TAE, ein Tris-Acetat-EDTA-Puffer, und TBE, ein Tris-Borat-EDTA-Puffer.

Für die spätere Aufreinigung von DNA aus dem Gel ist TAE-Puffer besser geeignet als TBE-Puffer.

(C. Mühlhardt, 2003)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Agarose
- Ethidiumbromid-Bad (5 mg/L Wasser)
- *Power Supply*
- 50x TAE-Puffer (pH 7.8)

Herstellung von 50x TAE-Puffer (pH 7.8):

Tris	242.3 g
NaAc	20.5 g
EDTA	372.24 g
pH 7.8 mit Essigsäure einstellen	

ad 1 L destilliertes Wasser

- 6x DNA-Probenpuffer

Herstellung von 10 mL 6x DNA-Probenpuffer:

1.5 g Ficoll/10 mL destilliertem Wasser

1 Spatelspitze Bromphenolblau in 1-2 mL destilliertem Wasser lösen

von dieser Bromphenolblau-Lösung bis zur gewünschten Farbintensität zur Ficoll-Lösung zugeben

Vorgehensweise:

- Aufkochen der entsprechenden Menge Agarose im entsprechenden Vol 1x TAE-Puffer
- Auffüllen der verdampften Flüssigkeitsmenge mit destilliertem Wasser
- Gel in den Schlitten mit dem gewünschten Kamm gießen
- auspolymerisiertes Gel mit dem Schlitten in die Elektrophorese-Apparatur einsetzen
- Gel mit 1x TAE-Puffer überfluten
- Kamm entfernen
- vorbereitete Proben auftragen
(zu den aufzutragenden Proben je $\frac{1}{5}$ des Volumens an 6x DNA-Probenpuffer gegeben)
- elektrophoretische Auftrennung bei ca. 0.5-5 V/cm Elektrodenabstand
- Stoppen des Gellaufs, wenn Bromphenolblau-Bande im unteren Drittel des Gels
- *Gel-Färbung:*
Gel ca. 10 min in Ethidiumbromid-Bad legen

Anmerkung:

Die einfachste Methode, Nukleinsäuren im Gel sichtbar zu machen, ist eine Färbung mit dem seit 1950 synthetisierten Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der eine trizyklische planare Gruppe enthält. Ethidiumbromid interkaliert mit diesem Ringsystem zwischen den Basenpaaren der Nukleinsäure (unabhängig von der Basen-Sequenz des Nukleinsäure-Abschnittes), wodurch es fixiert wird und seine Fluoreszenz gegenüber freiem Ethidiumbromid in der Lösung erhöht. Kurzwelliges Licht (254 – 260 nm) wird von Nukleinsäuren absorbiert und auf den Fluoreszenzfarbstoff übertragen, längerwelliges Licht (302 nm und 360 nm) wird von Ethidiumbromid direkt absorbiert. In beiden Fällen wird Energie im Bereich von 590 nm (= orange-roter Bereich des sichtbaren Spektrums) emittiert. Da die Emission im Nukleinsäure-Ethidiumbromid-Komplex ungefähr 20–30-fach stärker ist als die Emission des ungebundenen Ethidiumbromids, werden selbst kleine Nukleinsäure-Mengen im Hintergrund ungebundenen Ethidiumbromids sichtbar.

(W. Seyffert *et al*, 1998)

- kurzes Wässern des Ethidiumbromid-gefärbten Gels
- Betrachtung des Gels unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) auf UV-Transilluminator
- Fotografieren des Gels

4.12 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Am besten trennt man die DNA-Fragmente, die man später aus dem Gel isolieren will, in einem TAE-gepufferten Agarosegel auf, da das Borat in einem TBE-gepufferten Agarosegel mit vielen Reinigungsmethoden interferiert.

Wichtig ist außerdem, dass die entsprechende DNA-Bande bei einer Wellenlänge von $\lambda = 366 \text{ nm}$ ausgeschnitten wird, und zwar so schnell wie möglich, da DNA sehr empfindlich auf kurzwelliges, energiereiches UV-Licht reagiert und es unter anderem zu Depurinierungen, zur Bildung von Basendimeren, zu Strangbrüchen und anderen Schädigungen kommt.

(C. Mühlhardt, 2003)

4.12.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus TAE-gepufferten Agarosegelen mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ von QIAGEN

Diese Methode der Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen beruht auf Solubilisierung der Agarose durch chaotrope Salze (enthalten im unten erwähnten Puffer QG) und der anschließende Adsorption der DNA an eine Silika-Matrix unter Hochsalz-Bedingungen. Die Elution der DNA erfolgt mit Hilfe von Niedrigsalz-Lösungen.

(QIAquick® Spin Handbook, Qiagen)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Puffer QG
- Puffer PE mit Ethanol
- *QIAquick-spin-column* mit DNA-bindender Membran
- Sammelröhrchen
- raumtemperiertes 100 % Isopropanol
- autoklavierte 1.5 mL-Eppendorftubes
- steriles Wasser (Firma Braun)

Vorgehensweise:

- die entsprechende DNA-Bande im Gel bei einer Wellenlänge von $\lambda = 366 \text{ nm}$ ausschneiden
- Gewicht des Gel-Stückchens bestimmen
- Zugabe der dem Gewicht des Gelstückchens entsprechenden Menge an QG-Puffer
- Inkubation: 10 min
50°C-Thermomixer
16 060 g
(alle 2-3 min vortexen)
- Zugaben der dem Gewicht des Gelstückchens entsprechenden Menge an raumtemperiertem 100 % Isopropanol und mischen

- DNA-Agarose-QG-Isopropanol-Gemisch auf Silikasäulchen geben, welches in einem Sammelröhrchen steht
- Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
- Durchlauf verwerfen
Silikasäulchen zurück in Sammelröhrchen stellen
- Zugabe von 500 µL QG-Puffer
- Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
- Durchlauf verwerfen
Silikasäulchen zurück in Sammelröhrchen stellen
- Waschen:
Zugabe von 750 µL PE-Puffer
- Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
- Durchlauf verwerfen
Silikasäulchen zurück in Sammelröhrchen stellen
- Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
- Silikasäulchen in 1.5 mL-Eppendorftube stellen
Sammelröhrchen verwerfen
- Elution der DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen:
10 µL steriles Wasser in die Mitte der Membran pipettieren
Inkubation: 1 min
RT
- Zentrifugation: 1 min
RT
16 060 g
- Silikasäulchen verwerfen
Das Eluat im 1.5 mL-Eppendorftube enthält die isolierte, gereinigte DNA.

4.12.2 Isolierung von Plasmid-DNA-Fragmenten aus TAE-gepufferten Low Melting Point-Agarosegelen mittels „GELase™ Agarose Gel-Digesting Preparation Kit“ von EPICENTRE

Diese Methode der DNA-Isolierung und -Reinigung aus einem Agarosegel nutzt die Fähigkeit der Beta-Agarase I von *Pseudomonas atlantica*. Dieses Enzym kann langkettige Polysaccharide zu kurzen Oligosacchariden abbauen, indem es spezifisch das Agarose-Polysaccharid-Gerüst aus wiederholender 1,3-verbundener Beta-D-galactopyranose und 1,4-verbundener 3,6-anhydro-alpha-L-galactopyranose in *neoagaro*-Oligosaccharide spaltet. Auf diese Weise macht man aus einem DNA-haltigen Gelstück eine DNA-Lösung, die direkt weiterverwendet werden kann.

Voraussetzung für den Einsatz der Agarase ist die Verwendung von sog. *Low Melting Point*- (LMP-) Agarose für die Elektrophorese. Diese Agarose schmilzt schon bei 65°C und nicht erst bei 90°C wie normale Agarosen, und damit in einem Temperaturbereich, in dem DNA noch nicht denaturiert. Auch die Geliertemperatur liegt mit 29°C noch unter der Inkubationstemperatur der (meisten) Restriktionsenzyme. Deshalb kann man die nach dem Agarase-Verdau erhaltene DNA-Lösung auch direkt ohne vorherige Aufreinigung für einen Verdau einsetzen.

(C. Mühlhardt, 2003)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- 50x *GELase*TM-Reaktionspuffer
- Agarase-Enzym *GELase*TM (1 U/μL)
- 5 M Ammoniumacetat (pH 7.0)

Herstellung von 5 M Ammoniumacetat (pH 7.0): NH₄OAc 15,4 g/40 mL destilliertes Wasser

- raumtemperiertes 100 % Ethanol
- raumtemperiertes 70 % Ethanol

Herstellung von 70 % Ethanol: 100 % Ethanol 70 mL/100 mL destilliertes Wasser

- steriles Wasser (Firma Braun)
- autoklavierte 1.5mL-Eppendorftubes

Vorgehensweise:

- die entsprechende DNA-Bande im Gel bei einer Wellenlänge von $\lambda=366$ nm ausschneiden
- Gewicht des Gelstückchens bestimmen
- Zugabe der dem Gewicht des Gelstückchens entsprechenden Menge an 50x *GELase*TM-Reaktionspuffer
- Inkubation: ≥ 3 min pro 200 mg Gel
70°C-Thermomixer
450 rpm
(alle 2-3 min vortexen)
- Equilibrierung des DNA-Puffer-Gemisches,
da *GELase*TM ihre Aktivität bei höheren Temperaturen verliert
Inkubation: 2 min pro 200 mg Gel
45°C-Thermomixer
- Zugabe der entsprechenden Menge an *GELase*TM
- Inkubation: je nach *GELase*TM-Menge 15-60 min
45°C-Thermomixer

- **OPTIONAL: Aufkonzentration der DNA über Ammoniumacetat /Ethanol-Präzipitation**

- Zugabe der gleichen Menge frisch angesetzttes Ammoniumacetat zum Agarose-Verdau

Anmerkung:

Durch die Zugabe des Ammoniumsalzes Erhöhung der Löslichkeit der Oligosaccharide in Ethanol. Verwendung anderer Salze für die Ethanol-Fällung führt zur Kopräzipitation der Oligosaccharide.

- gut mischen

- Zugabe von 4 Vol raumtemperiertem 100 % Ethanol
 - Anmerkung:
Ethanol muss Raumtemperatur haben, da kaltes Ethanol die Oligosaccharide der verdauten Agarose kopräzipitiert.
- **WENN** Konzentration der Nukleinsäure geringer als 500 ng/mL:
 - Inkubation: über Nacht
RT
- Zentrifugation: je nach Nukleinsäure-Konzentration und –Länge 15-30 min
RT
16 060 g
- Überstand vorsichtig abnehmen
- Waschen des DNA-Pellets:
Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 70 % Ethanol
Pellet resuspendieren
- Zentrifugation: 15 – 30 min
RT
16 060 g
- Überstand verwerfen
- Pellet luft-trocknen
- getrocknetes DNA-Pellet in entsprechendem Vol sterilem Wasser (50 – 200 µL) aufnehmen

4.13 *Baculovirus Expression Vector System*

Das **Baculovirus Expression Vector System (BEVS)** ist ein vielseitiges eukaryontisches System für die heterologe Genexpression in Insektenzellen.

Viele Proteine werden posttranslational modifiziert (Glykosylierung, Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung). Modifikationen dieser Art werden in Prokaryonten nicht mit der gewünschten Spezifität durchgeführt. Dadurch entsteht in vielen Fällen das Problem, dass die biologische Aktivität eukaryontischer Proteinprodukte durch bakterielle Synthese nicht erreicht wird. Aus diesem Grund wurden animalische Transformationssysteme entwickelt, die in zwei Typenklassen eingeordnet werden: Systeme, die stabile (transiente) Expression transfizierter DNA in Zellkultur bewirken, und Systeme, bei denen virale Expressionsvektoren wie SV40-Derivate, Retrovirus-Derivate oder Baculoviren benutzt werden.

Weil die Expression in Insektenzellen erfolgt, besitzen die Proteine anschließend viele der eukaryontischen Proteinmodifikationen und damit ihre biologische Aktivität und Funktion, auf die man z.B. bei bakteriellen Expressionssystemen verzichten muss. Auch die Prozessierung und der Transport der Proteine erfolgt in Insektenzellen ähnlich wie in Säugerzellen, so dass die Expression von zytoplasmatischen, sekretierten und membranständigen Proteinen möglich ist, was bei Bakterien Schwierigkeiten bereitet. Zudem werden keine Helferviren benötigt. Weitere Vorteile dieses eukaryontischen Expressionssystems sind das schnelle Wachstum der Insektenzellen, die Insektenzellen benötigen keine CO₂-Inkubation und sie können auch als Suspension kultiviert werden, was die Präparation in einem größeren Maßstab erleichtert.

(Anleitungshandbuch „Baculovirus Expression Vector System“, 6. Auflage, Pharmingen)

Baculoviren (Familie *Baculoviridae*) gehören zu einer mannigfaltigen Gruppe großer Doppelstrang-DNA-Viren, die viele verschiedene Insektenspezies als ihre natürlichen Wirte infizieren. Von den Baculoviren sind über 500 verschiedene Spezies bekannt. Das Baculovirus-Genom wird im Zellkern infizierter Wirtszellen repliziert und transkribiert. Die große Baculovirus-DNA wird dabei in stäbchenförmige Nuklearkapseln verpackt.

Das Baculovirus, das im nachfolgenden beschriebenen Expressionssystem BEVS genutzt wird, gehört zur Gruppe der nukleären Polyhedrosisviren: *Autographa californica* Nucleäres *Polyhedrosisvirus* (AcNPV) bzw. modifizierte Varianten davon. Diese infizieren ganz spezifisch *Spodoptera frugiperda*.

Spodoptera frugiperda, auch als *Fall armyworm* bekannt, zählt zur Familie der Eulenfalter (*Noctuidae*), die zur Ordnung der Schmetterlinge (*Lepidoptera*) gehört. Eulenfalter sind großteils dämmerungs- oder nachtaktive Schmetterlinge und sind mit weltweit 250 000 Arten die größte aller Schmetterlingsfamilien. Eulenfalter sind weitverbreitet, von den Polargebieten bis zu den Hochgebirge und den Tropen. *Spodoptera frugiperda* ist in den tropischen Regionen der westlichen Hemisphäre von den Vereinigten Staaten bis nach Argentinien beheimatet. Abbildung 10 zeigt einen männlichen und einen weiblichen *Spodoptera frugiperda*-Falter im Erwachsenenstadium.

(Anleitungshandbuch „Baculovirus Expression Vector System“, 6. Auflage, Pharmingen)

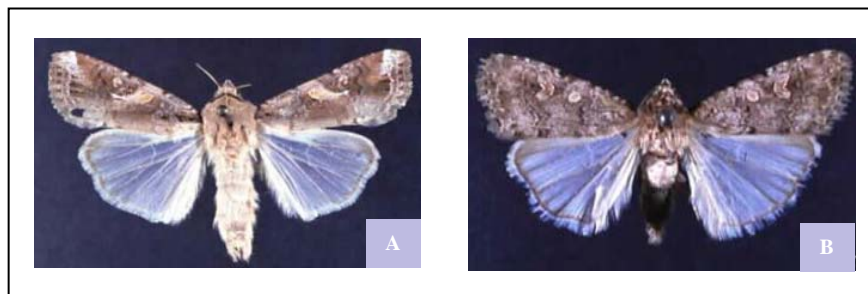


Abbildung 10: *Spodoptera frugiperda* im Erwachsenenstadium.

A: Männlicher *Fall armyworm* (*Spodoptera frugiperda*) des typischen Erwachsenen (J.E. Smith). **B:** Weiblicher *Fall armyworm* (*Spodoptera frugiperda*) des typischen Erwachsenen (J.E. Smith).

Beide Fotografien von John L. Capinera, Universität von Florida

Zu den etablierten Zelllinien, die im BEVS verwendet werden, gehören Sf21 und Sf9, die aus dem USDA Insect Pathology Laboratory stammen. Ihren Ursprung haben beide Zelllinien in der IPLB-SF2-Zelllinie, die aus Eierstockgewebe von *Spodoptera frugiperda* im Puppenstadium stammt (J. L. Vaughn *et al.*, 1977). Die Sf9-Zelllinie wurde von G.E. Smith und C.L. Cherry 1983 aus der Ursprungs-Zelllinie IPLB-SF21-AE (Sf21) kloniert.

Sf9-Zellen besitzen ein kugelförmiges Aussehen mit leicht granulärer Erscheinung und ihre Verdopplungszeit beträgt etwa 24 Stunden. Sf9-Zellen werden bei 27°C kultiviert, sowohl als Suspension als auch als Monolayer.

(Anleitungshandbuch „Baculovirus Expression Vector System“, 6. Auflage, Pharmingen)

Vorteile des BEVS gegenüber prokaryontischen und anderen eukaryontischen Expressionssystemen:

- ❖ hohe Proteinexpression
- ❖ post-translationale Modifikationen
(Bildung von Disulfid-Bindungen, Phosphorylierung, Glykosylierung, Oligomerisierung, richtiges Falten)
- ❖ Säugerzellen entsprechende zelluläre Kompartimentierung der Proteine
(sekretiert, membrangebunden, zytoplasmatisch oder nukleär)
- ❖ Aufnahmefähigkeit großer cDNA-Stücke von bis zu 15 kb
- ❖ simultane Expression mehrerer Gene

nach: www.pharmlingen.com

Das AcNPV-Genom besteht aus doppelsträngiger zirkulärer DNA von ca. 130 kb Länge. Diese Größe macht es nahezu unmöglich, ein kloniertes Gen, das zur Produktion eines rekombinanten Proteins verwendet werden soll, mit Hilfe der üblichen *in vitro*-Methoden in das AcNPV-Genom zu integrieren. Durch homologe Rekombination ist es aber dennoch möglich Fremd-DNA, die aus den verschiedensten Quellen (Bakterien, Viren, Pflanzen, Tiere) stammen kann, in die Virus-DNA zu inserieren. Dazu muss sich die Fremd-DNA in einem Transfervektor befinden, in dem sie von bestimmten Rekombinationssequenzen flankiert wird, die den Rekombinationsstellen im Baculovirus-Genom homolog sind. Diese flankieren ein Gen in einer für den Gewebekultur-Lebenszyklus nicht-essentiellen Region der Virus-DNA. Zu solchen für den Gewebekultur-Lebenszyklus nicht essentiellen, und damit ersetzbaren Genen gehören z. B. *Polyhedrin* oder *p10*. Jedes der beide Gene steht unter Kontrolle eines sehr starken Promotors. Die Co-Transfektion des Transfervektors, der das fremde Gen enthält, und linearisierter AcNPV-Baculovirus-DNA in *Spodoptera frugiperda*-Zellen erlaubt die Rekombination zwischen homologen Stellen. Dabei wird das fremde Gen aus dem Transfervektor auf die AcNPV-DNA übertragen. Die Infektion der Insektenzellen mit rekombinanter Baculovirus-DNA führt zum Abschalten der Wirtsgenexpression und erlaubt eine hohe Syntheserate an rekombinanter mRNA und eine hohe Proteinproduktion. (Anleitungshandbuch „Baculovirus Expression Vector System“, 6. Auflage, Pharmingen)

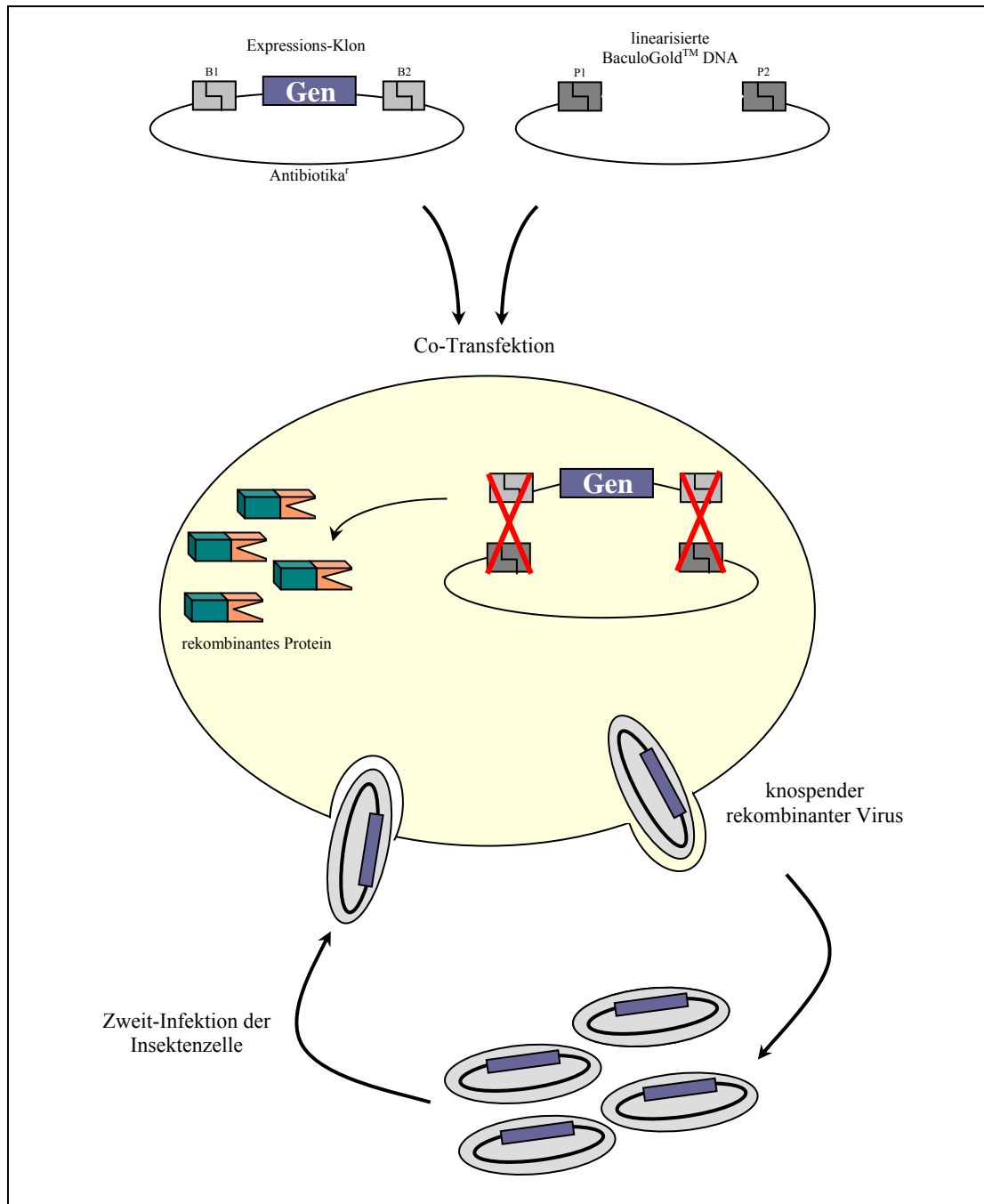


Abbildung 11: Lebenszyklus des Baculovirus *in vitro*.

Das Baculovirus-Genom ist zu groß, um fremde Gene einfach direkt einzubauen. Daher wird das zu inserierende fremde Gen zuerst in einen Transfektor (Expressionsklon) kloniert. Das zu inserierende fremde Gen wird in dem Transfektor von Sequenzen flankiert (5' und 3'), die homolog dem Baculovirus sind. Die linearisierte Baculovirus-DNA (*BaculoGoldTM* DNA) und DNA des Expressionsklons werden in Sf9-Insektenzellen co-transfiziert. In den Insektenzellen findet dann eine homologe Rekombination zwischen den homologen Regionen des Transfektors und der *BaculoGoldTM* DNA statt. Der rekombinante Virus produziert dann rekombinantes Protein und infiziert weitere Insektenzellen.

Anleitungshandbuch „Baculovirus Expression Vector System“, 6. Auflage, Pharmingen (modifiziert)

4.13.1 Co-Transfektion von adhärenenten Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* mit LIPOFECTIN® Reagent von Invitrogen

Die Übertragung extrazellulärer Fremd-DNA in eine Eukaryontenzelle wird als Transfektion bezeichnet. Dabei wird eine artfremde DNA in einen Rezipienten eingebracht, exprimiert und kann an die Tochterzellen weitergegeben werden. Dies setzt in der Regel die Aufnahme eines eigenständigen Replikons voraus. In Frage kommen Genome von Viren, Phagen oder Plasmide. Im Gegensatz zur Transformation ist ein Einbau in das Genom des Rezipienten nicht erforderlich.

Bei einer Lipofektion wird die DNA durch Fusion mit der Zelle aufgenommen. Bei dieser Methode erfolgt die Einführung der Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen über kationische Liposome, die den Transfer erleichtern.

Die Methode hier verwendet das synthetische kationische Lipid *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-triethylammonium-Chlorid (DOTMA), das speziell dafür entwickelt wurde, um positiv geladene Liposome zu bilden, die spontan mit DNA oder RNA interagieren (Felgner *at al.*, 1987). In kommerziell erhältlichen Lipofectin-Reagenzien wie diesem hier, wird DOTMA 1:1 mit dem Phospholipid-Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin (DOPE) gemischt. DOPE ist ein ungeladenes „Helfer“-Lipid, das die Fusion mit der Zelle erleichtert und so die Effizienz erhöht. Mischt man dieses Reagenz-Gemisch mit einer DNA-Lösung, so wird die DNA von den Liposomen gebunden. Bei Zugabe zu den Zellen bindet der DNA-Liposomen-Komplexe an die negativ geladene Zelloberfläche. Die Liposomen fusionieren dann mit der Zellmembran und bringen auf diese Weise die DNA in die Zellen.

(C. Mühlhardt, 1998)

Faktoren, die für eine erfolgreiche Liposomen-vermittelte Transfektion von DNA wichtig sind:

- 1) Der Vorgang wird durch Serum gehemmt.
Es wird vermutet, dass Serumkomponenten an die DNA-Lipid-Komplexe binden und diese dadurch weniger effizient mit der Zelloberfläche interagieren können.
- 2) Verwendung von Polystyren-Reaktionsgefäße,
weil die DNA-Lipid-Komplexe die Tendenz haben sowohl an Glas- als auch an Polypropylen-Oberflächen zu absorbieren.
- 3) Weder die DNA noch die Liposomen dürfen im Transfektions-Mix zu konzentriert sein.
DNA-Konzentrationen über 100 µg/mL oder Liposomen-Konzentrationen über 500 µg/mL führen zur Bildung großer Aggregate, die die Effizienz des DNA-Transfers reduzieren.

benötigte Materialien und Reagenzien:

- *Spodoptera frugiperda*-Zellen Sf9 in log-Phase
- vorgewärmtes Zellmedium *Ex-Cell*TM 400
- sterile 6-well-Platten oder sterile T25-Zellkulturflaschen
- sterile 1.5 mL-Eppendorftubes
- steriles 150 mM Natriumchlorid

Herstellung von 150 mM Natriumchlorid: NaCl 2,2 g/250 mL destilliertes Wasser

- Plasmid-DNA des Expressionsklons

- *LipofectinTM*-Reagenz
- linearisierte Baculovirus-DNA *BaculoGoldTM* (0,1 µg/1µL)

Vorgehensweise: (Angaben beziehen sich auf 1 Transfektionsansatz)

- Aussäen von 3×10^6 Zellen/T25-Zellkulturflasche bzw. 3×10^6 Zellen/*well* einer 6-well-Platte
 - mit *Ex-CellTM 400*-Medium auf 4 mL auffüllen
 - Ansetzen von Transfektionsansatz A:
 - 0,25 µg *BaculoGoldTM*-DNA
 - 1,5 µg Plasmid-DNA
 - ad 100 µL mit sterilem 150 mM NaCl
 - Ansetzen von Transfektionsansatz B:
 - 50 µL steriles 150 mM NaCl
 - 20 µL *Lipofectin_{gut}* gevortex
- } **GUT VORTEXEN !!!**
- Transfektionsansätze A und B vorsichtig miteinander mischen
 - Inkubation: 15 min
RT
 - vorsichtige Zugabe des Transfektionsansatzes auf die Sf9-Zellen
 - Inkubation: 4-7 Tage
27°C-Brutschrank
 - Wenn die Infektion deutlich sichtbar* ist bzw. spätestens nach 7 Tagen den Überstand, der die rekombinanten Viren enthält, abnehmen:
 - Zellen abklopfen oder abschaben
 - in Zentrifugen-Röhrchen überführen
 - Zentrifugation: 10 min
RT
4 418 g
 - virushaltigen Überstand abnehmen und bei 4°C lagern
Dieser virushaltige Überstand der Lipofection wird dann für die Infektion neuer Sf9-Zellen verwendet, für die sog. Erst-Virusamplifikation (siehe 4.13.2).

* Infizierte Zellen sind größer als nicht-infizierte Zellen, haben vergrößerte Nuklei, haben ihre Vermehrung eingestellt und sind oft nicht mehr adhärent, sondern schwimmen im Medium (siehe Abbildung 39).

4.13.2 Virus-Amplifikation (1.VA und 2.VA) in Sf9-Zellen

benötigte Materialien und Reagenzien:

- *Spodoptera frugiperda*-Zellen Sf9 in log-Phase
- vorgewärmtes Zellmedium *Ex-CellTM 400*
- sterile Zellkulturflaschen

Vorgehensweise:

- Aussäen der entsprechenden Zellmenge und Zugabe der noch benötigten Menge an Medium:

T75-Zellkulturflasche für 1.VA: 6.5×10^6 Zellen
mit vorgewärmtem Medium ad 10 mL
für 1.VA: 1.5 mL Lipofektions-Ansatz

T175-Zellkulturflasche für 2.VA: 15×10^6 Zellen
mit vorgewärmtem Medium ad 25 mL
für 2.VA: 0.5-1 mL der 1.VA [⊗]

[⊗] Volumenangabe, wenn kein Virustiter bekannt ist. Die Menge der zugegebenen Viruslösung ist davon abhängig, wie gut bzw. schlecht die Zellen von dem Virus infiziert wurden.

- Inkubation: 4-7 Tage
27°C-Brutschrank
- Wenn die Infektion deutlich sichtbar* ist bzw. spätestens nach 7 Tagen den Überstand, der die rekombinanten Viren enthält, abnehmen:
 - Zellen abklopfen oder abschaben
 - in Zentrifugen-Röhrchen überführen
 - Zentrifugation: 10 min
RT
4 418 g
 - virushaltigen Überstand abnehmen und bei 4°C lagern
Der virushaltige Überstand der 1.VA wird dann für die Infektion neuer Sf9-Zellen verwendet, für die sog. Zweit-Virusamplifikation (2.VA). Der virushaltige Überstand der 2.VA wird für die Protein-Expression verwendet.

* Infizierte Zellen sind größer als nicht-infizierte Zellen, haben vergrößerte Nuklei, haben ihre Vermehrung eingestellt und sind oft nicht mehr adhärent, sondern schwimmen im Medium (siehe Abbildung 39).

4.13.3 Protein-Expression (PE) in Sf9-Zellen

benötigte Materialien und Reagenzien:

- *Spodoptera frugiperda*-Zellen Sf9 in log-Phase
- vorgewärmtes Zellmedium *Ex-CellTM 400*
- sterile Zellkulturflaschen oder Spinner-Flaschen

Vorgehensweise:

- Aussäen der entsprechenden Zellmenge und Zugabe der noch benötigten Menge an Medium:

T25-Zellkulturflasche: 4.4×10^6 Zellen
mit vorgewärmtem Medium ad 3 mL
100-200 μ L 2.VA [⊗]

- T75-Zellkulturflasche** : 13×10^6 Zellen
mit vorgewärmtem Medium ad 10 mL
0.25-1 mL der 2.VA \otimes
- T175-Zellkulturflasche** : 30×10^6 Zellen
mit vorgewärmtem Medium ad 25 mL
0.65-1.5 mL der 2.VA \otimes
- 50 mL-Spinnerflasche** : 1×10^8 Zellen
mit vorgewärmtem Medium ad 50 mL
2.5-5 mL der 2.VA \otimes
- 100 mL-Spinnerflasche** : 2×10^8 Zellen
mit vorgewärmtem Medium ad 100 mL
5-10 mL der 2.VA \otimes
- 200 mL-Spinnerflasche** : 4×10^8 Zellen
mit vorgewärmtem Medium ad 200 mL
10-20 mL der 2.VA \otimes

\otimes Volumenangabe, wenn kein Virustiter bekannt ist. Die Menge der Zugegebenen Viruslösung ist davon abhängig, wie gut bzw. schlecht die Zellen von dem Virus infiziert wurden.

- Inkubation: 4-7 Tage
27°C-Brutschrank
- Wenn die Infektion in den T-Kulturflaschen bzw. Spinnerflaschen deutlich sichtbar* ist, erfolgt die Ernte der Virus-infizierten und damit Protein-exprimierenden Sf9-Zellen:
 - Zellen abklopfen oder abschaben (bei den T-Kulturflaschen)
 - Zellsuspension in Zentrifugen-Röhrchen überführen
 - Zentrifugation: 15 min
RT
4 418 g
 - Überstand verwerfen
Zellpellet bei -80°C einfrieren

* Infizierte Zellen sind größer als nicht-infizierte Zellen, haben vergrößerte Nuklei, haben ihre Vermehrung eingestellt und sind oft nicht mehr adhärent, sondern schwimmen im Medium (siehe Abbildung 39).

4.14 Analytische Präparation von Baculo-exprimierten Proteinen aus Sf9-Zellen über Affinitätschromatographie

Die Verwendung von Fusionstags zur Reinigung (über Affinitätschromatographie) und zum Nachweis rekombinanter Proteine ist eine gebräuchliche Methode. Die Affinitätschromatographie nutzt dabei die Tatsache, dass manche Proteine bzw. Proteinsequenzen (Tags) sehr hohe Affinitäten für bestimmte Liganden besitzen, die zum Teil für die Aktivität der Tags notwendig sind (Substrate, Kofaktoren). Wird nun ein solcher

Ligand kovalent an eine Säulenmatrix gebunden und Zelllysate auf die Säule geladen, dann werden alle Proteine, die mit dem Liganden interagieren können, selektiv auf der Säule gebunden. Die restlichen, nicht-bindenden Proteine bleiben im Durchfluss.

Zu den bekanntesten Fusionstags zählen z.B. die Glutathion-S-Transferase (GST) und der 6x His-Tag (siehe Tabelle 3).

Fusionstag	Ligand/Matrix
6x His	Ni ²⁺ -NTA
Glutathion-S-Transferase (GST)	Glutathion-Sepharose
Maltose Binding Protein (MBP)	Amylose-Harz
Galactose Binding Protein	Galactose-Sepharose
Avidin	Biotin
Streptavidin	Biotin
Strep-Tag	Streptavidin
c-Myc	Anti-Myc-Antikörper
Staphylococcal Protein A	IgG-Sepharose
Staphylococcal Protein G	Albumin
FLAG-Peptid	Anti-FLAG monoklonaler Antikörper
Dihydrofolat-Reduktase	Methotrexate-Agarose

Tabelle 3: Bekannte Fusionstags und ihre Liganden bzw. Matrices.

D. Ganten *et al.* "Encyclopic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine: Recombinant Protein Expression in Bacteria" (in press)

Die Glutathion-S-Transferase (aus *Schistosoma japonicum*) hat eine hohe Affinität für Glutathion. GST hat in Zellen normalerweise die Funktion toxische und oxidative Stoffe zu neutralisieren, indem sie die Bindung von verschiedenen Substanzen an die Schwefelgruppe von reduziertem Glutathion katalysiert. Solche Glutathion-*adducts* sind meistens weniger toxisch und haben im allgemeinen eine höhere Wasserlöslichkeit als die freien Komponenten, was ihre Entfernung aus der Zelle vereinfacht.

Ist die Glutathion-S-Transferase an ein Protein gekoppelt, so kann das Fusionsprotein über eine Säule mit immobilisiertem, reduziertem Glutathion gereinigt werden. Nach den Waschschritten wird das Fusionsprotein mit einer Glutathion-Lösung von der Säule eluiert (siehe Abbildung 12).

Bei Bedarf kann ein solcher Fusionstag zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe einer Protease von dem Protein abgespalten werden (z.B. „PreScission™ Protease“ für N-terminale GST-Tags von Amersham Biosciences GE Healthcare) (Handbuch „GST Gene Fusion“, Edition AA, Amersham Biosciences GE Healthcare).

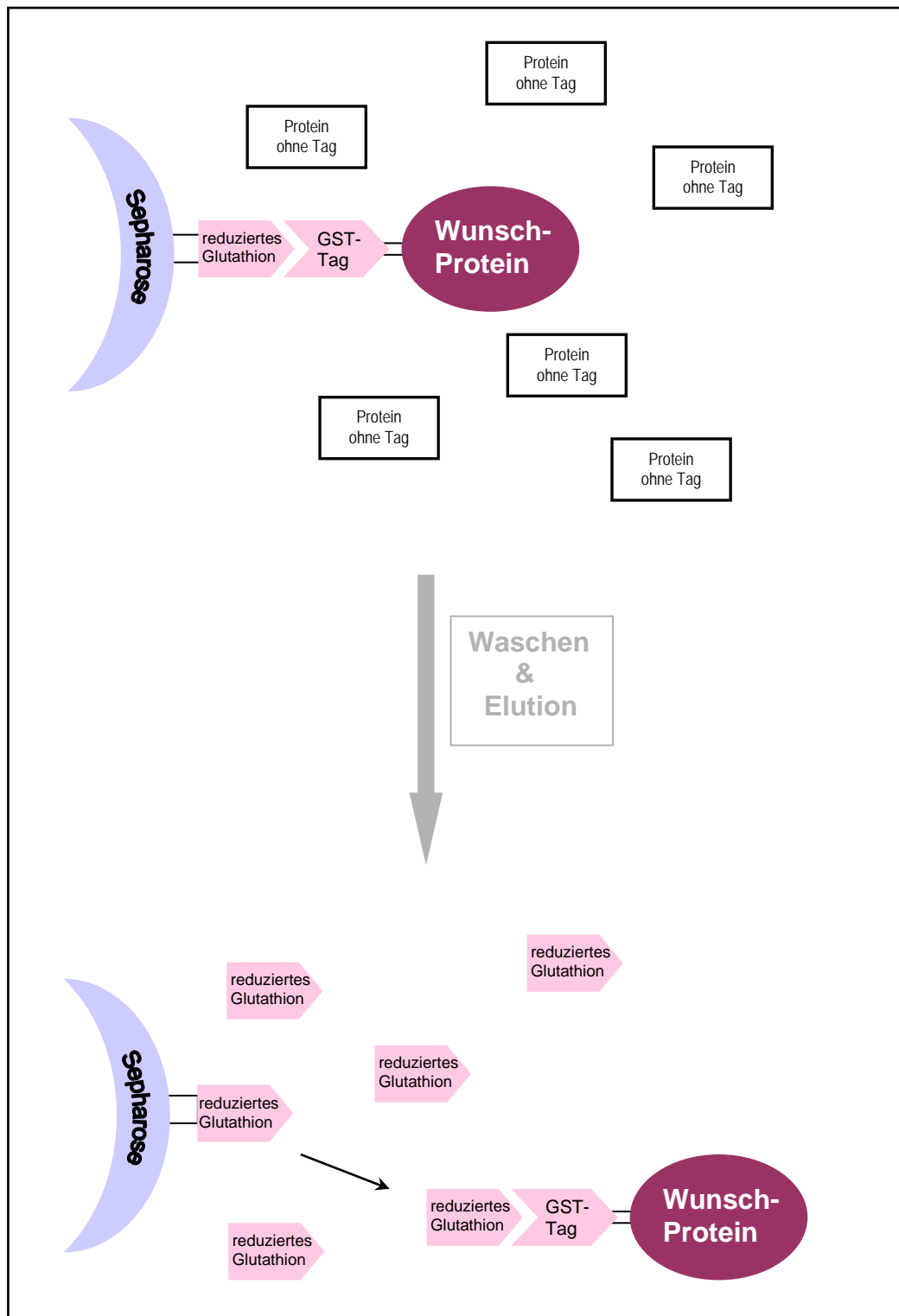


Abbildung 12: Schematische Darstellung der GST-Affinitätschromatographie.

Das GST-Fusionsprotein bindet spezifisch an das an Sepharose immobilisierte reduzierte Glutathion. Durch intensives Waschen werden alle Proteine ohne GST-Tag entfernt und es befindet sich nur noch das GST-Fusionsprotein auf der Säule. Eluiert wird mit einer hohen Konzentration an Glutathion.

4.14.1 Reinigung von GST-getaggten Proteinen mittels Batch-Verfahren

benötigte Materialien und Reagenzien:

- infizierte Zellen einer T25-, T75 oder T175-Zellkulturflasche
- 15 mL- oder 50 mL-Greiner-Röhrchen
- raumtemperiertes Bradford-Reagenz, ready-to-use
- 1.5 mL-Eppendorf-Tubes
- GSH-Agarose
- 1x Dulbeccos PBS ohne Magnesium und Calcium
- Lysepuffer für Sf9-Zellen

Herstellung von Lysepuffer:

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1,25 mL	
1 M NaCl	5 mL	
Triton X-100	0,5 mL	
Protease-Inhibitoren	5 Tabletten	} immer frisch zugeben
β-Mercaptoethanol	50 µL	

ad 50 mL destilliertes Wasser

- gekühlter GST-Waschpuffer_{mit Triton}

Herstellung von GST-Waschpuffer_{mit Triton}:

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1,25 mL	
1 M NaCl	5 mL	
Triton X-100	0,05 mL	
β-Mercaptoethanol	50 µL	immer frisch zugeben

ad 50 mL destilliertes Wasser

- gekühlter GST-Waschpuffer_{ohne Triton}

Herstellung von GST-Waschpuffer_{ohne Triton}:

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1,25 mL	
1 M NaCl	5 mL	
β-Mercaptoethanol	50 µL	immer frisch zugeben

ad 50 mL destilliertes Wasser

- raumtemperierter GST-Elutionspuffer

Herstellung von GST-Elutionspuffer:

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0,75 mL	
1 M NaCl	1,5 mL	
86% Glycerin	7 mL	
β-Mercaptoethanol	50 µL	immer frisch zugeben
reduziertes Glutathion	46 mg	

ad 15 mL destilliertes Wasser

Vorgehensweise:

- Zellen ernten und in Greiner-Röhrchen überführen
- Zentrifugation: 10 min
4°C
836 g
- Überstand verwerfen
- Zellpellet mit 1x PBS waschen

- Zellyse:

Zugabe von Lysepuffer

T25: 0,5 mL
T75: 1 mL
T175: 1,5 – 2 mL

gut vortexen

- Inkubation: 30 min
auf Eis
zwischendurch immer wieder gut vortexen
- Zentrifugation: 7 min
4°C
1 800 g
- proteinhaltigen Überstand abnehmen
- Zugabe der GSH-Agarose

T25: 50 µL
T75: 100 µL
T175: 200 µL

- Inkubation: 2 h – über Nacht
4°C
Kipp-/Rollenmischer
- Zentrifugation: 7 min
4°C
1 800 g
- Überstand abnehmen (und aufbewahren)
- Waschen des Pellets:
2x mit 250 µL kaltem GST-Waschpuffer_{mit Triton}
3x mit 250 µL kaltem GST-Waschpuffer_{ohne Triton}

- Elution:
(Elutionsschritt so oft wiederholen, bis Bradford-Tüpfeltest (siehe 4.14.3) negativ, d. h. kaum Blaufärbung.)
Zugabe von raumtemperiertem GST-Elutionspuffer

T25: 50 – 100 µL
T75: 50 – 200 µL
T175: 50 – 300 µL

Pellet aufschlämmen

- Zentrifugation: 7 min
4°C
1 800 g
- proteinhaltigen Überstand abnehmen
- Bradford-Tüpfelprobe machen (siehe 4.14.3)

4.14.2 Reinigung von GST-getaggtten Proteinen mit selbst-gepackten Säulen

benötigte Materialien und Reagenzien:

- infizierte Zellen einer Spinner-Flasche
- 50 mL-Greiner-Röhrchen
- GSH-Agarose
- raumtemperiertes Bradford-Reagenz, ready-to-use
- 1.5 mL-Eppendorf-Tubes
- leere Chromatographie-Säulen 2mL-Bettvolumen, Polyethylen-Fritte
- 1x Dulbeccos PBS ohne Magnesium und Calcium
- Lysepuffer für Sf9-Zellen

Herstellung von Lysepuffer:

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1,25 mL	
1 M NaCl	5 mL	
Triton X-100	0,5 mL	
Protease-Inhibitoren	5 Tabletten	} immer frisch zugeben
β-Mercaptoethanol	50 µL	

ad 50 mL destilliertes Wasser

- gekühlter GST-Waschpuffer_{mit Triton}

Herstellung von GST-Waschpuffer_{mit Triton}:

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1,25 mL	
1 M NaCl	5 mL	
Triton X-100	0,05 mL	
β-Mercaptoethanol	50 µL	immer frisch zugeben

ad 50 mL destilliertes Wasser

- gekühlter GST-Waschpuffer_{ohne Triton}

Herstellung von GST-Waschpuffer_{ohne Triton}:

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1,25 mL	
1 M NaCl	5 mL	
β-Mercaptoethanol	50 µL	immer frisch zugeben

ad 50 mL destilliertes Wasser

- raumtemperierter GST-Elutionspuffer

Herstellung von GST-Elutionspuffer:

1M Tris-HCl (pH 8.0)	0,75 mL	
1M NaCl	1,5 mL	
86% Glycerin	7 mL	
β-Mercaptoethanol	50 µL	immer frisch zugeben
reduziertes Glutathion	46 mg	

ad 15 mL destilliertes Wasser

Vorgehensweise:

- Zellen ernten und in 50 mL-Greiner-Röhrchen überführen
- Zentrifugation: 10 min
4°C
836 g
- Überstand verwerfen

- Zellpellet mit 1x PBS waschen
- Zellyse:
Zugabe von Lysepuffer

100 mL-Spinnerflasche: 5 mL
200 mL-Spinnerflasche: 10 mL
400 mL-Spinnerflasche: 15 mL

gut vortexen

- Inkubation: 30 min
auf Eis
zwischenzeitlich immer wieder gut vortexen
- Zentrifugation: 10 min
4°C
836 g
- proteinhaltigen Überstand abnehmen
- Zugabe der GSH-Agarose

100 mL-Spinnerflasche: 1.5 mL
200 mL-Spinnerflasche: 2 mL
400 mL-Spinnerflasche: 2 mL

- Inkubation: 2 h – über Nacht
4°C
Kipp-/Rollenmischer
- Zentrifugation: 10 min
4°C
836 g

zwischenzeitlich: Polyethylen-Fritte der Säule mit GST-Waschpuffer equilibrieren

- Überstand abnehmen (und für Kontrolle in Coomassie-Gel aufbewahren)
- Agarosebeads mit kaltem Waschpuffer aufschlämmen und in Chromatographie-Säulchen überführen
- Waschen der Agarosebeads:
3x mit 2 mL kaltem Waschpuffer_{mit Triton}
3x mit 2 mL kaltem Waschpuffer_{ohne Triton}
- Elution:
Elutionsschritt so oft wiederholen, bis Bradford-Tüpfeltest (siehe 4.14.3) negativ, d.h. kaum Blaufärbung !
Zugabe von 100-300 µL raumtemperiertem GST-Elutionspuffer
Inkubation: 5 - 10 min
RT
- proteinhaltigen Durchlauf (Eluat) auffangen
- Bradford-Tüpfelprobe machen (siehe 4.14.3)

4.14.3 Bradford-Tüpfeltest

benötigte Materialien und Reagenzien:

- raumtemperiertes Bradford-Reagenz, ready-to-use
- Mikrotiterplatte

- Proteinprobe

Vorgehensweise:

- 100 µL raumtemperiertes Bradford-Reagenz in Mikrotiterplatte vorlegen
- 5-10 µL der Probe zugeben
- Inkubation: 5-15 min
RT
- Beurteilung des Farbumschlages bzw. der Blaufärbung der Bradford-Lösung

4.15 quantitative Protein-Bestimmung mittels Bradford-Test im ELISA-Reader

Es existiert eine ganze Reihe verschiedener Methoden, um Proteine in Lösungen quantitativ zu bestimmen.

Methoden, mit denen man Proteine unter gewissen Voraussetzungen auch in komplexen Mischungen und Rohextrakten einigermaßen gut quantitativ bestimmen kann, beruhen auf spezifischen Farbreaktionen.

Die klassische Methode darunter ist der Lowry-Test, bei dem Cu^+ -Ionen aus der Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz einen instabilen blauen Komplex bilden, der als Maß der Proteinkonzentration dient.

Einfacher und weniger störanfällige Methoden sind jedoch die Proteinbestimmungen nach Bradford (M. M. Bradford, 1976) und der BCA-Test.

Der Bradford-Test beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliantblue G-250 an Proteine (siehe Abbildung 13). Der Farbstoff bindet über spezifische hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen bevorzugt an Arginin-Reste sowie im geringeren Maße auch an einige andere basische und aromatische Aminosäuren (S. J. Compton *et al.*, 1985).

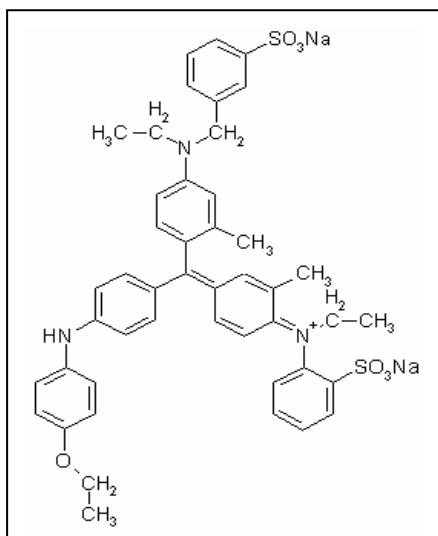


Abbildung 13: Strukturformel Coomassie Brilliantblue R250.

W.A. Eckert *et al.*, „Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie“ (1997)

In saurer Lösung liegt der Trimethylmethan-Farbstoff hauptsächlich in der protonierten, kationischen Form mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm vor. Bei Bildung des Farbstoff-Protein-Komplexes wird dagegen die im Gleichgewicht mit der kationischen Form stehenden, anionischen Form des Farbstoffes stabilisiert. Die anionische Form hat ein Absorptionsmaximum von 595 nm (Compton *et al.*, 1985). Da der Extinktionskoeffizient des Protein-Farbstoff-Komplexes sehr viel höher ist als der des freien Farbstoffes, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz gemessen werden. Allerdings besteht eine gewisse Farbvariabilität der Farbausbeute bei verschiedenen Proteinen (siehe Tabelle 4).

(W. A. Eckert *et al.*, 1997)

Protein	relative Farbausbeute in % (BSA = 100%)
Rinderserumalbumin (BSA)	100
Cytochrom C	108
Ribonuclease A	82
Carboanhydrase	81
Lysozym	80
Ovalbumin	76
Gelatine	53
Immunglobulin G	42
Trypsin	40
Pepsin	28
Mittelwert für eine Vielzahl von Proteinen	82

Tabelle 4: Relative Farbausbeute verschiedener Proteine mit Bradford-Reagenz.

S. M. Read *et al.* (1981)

Die Nachweisgrenze der Bradford-Methode liegt unter optimalen Bedingungen im 1 mL-Assay unter 1 µg Protein (S. M. Read *et al.*, 1981). Zu den optimalen Bedingungen gehört unter anderem, dass die Probe relativ frei von Detergenzien wie SDS, Triton oder Nonidet P-40 ist, da diese bei Konzentrationen über 0.1 % die Bildung des Farbkomplexes behindern. (W.A. Eckert *et al.*, 1997)

Der Vorteile der Bradford-Methode liegt in der Schnelligkeit und minimalen Pipettierarbeit. Von Nachteil kann allerdings sein, dass die Reaktion in einem sauren Milieu abläuft, in dem viele Proteine ausfallen können.

(H. Rehm, 2002)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- raumtemperiertes Bradford-Reagenz, ready-to-use
- Protein-Standard BSA (1 mg/mL)
- 1.5 mL-Eppendorftubes
- Mikrotiterplatte
- zu vermessende Protein-Lösungen
- steriles Wasser (Firma Braun)

Vorgehensweise beim Ansetzen der Protein-Standard-Reihe:

- Standard-Reihe nach folgendem Schema pipettieren:

Verdünnung der BSA-Stammlösung	Volumen BSA-Stammlösung	Volumen Wasser (ad 500 µL)	Protein-Konzentration [µg BSA / 50 µL]
1:40	25 µL	475 µL	2,5 µg
1:16	62,5 µL	437,5 µL	6,25 µg
1:8	125 µL	375 µL	12,5 µg
1:5,33	187,5 µL	312,5 µL	18,75 µg
1:4	250 µL	250 µL	25 µg
1:3,2	312,5 µL	187,5 µL	31,25 µg

- Lagerung der Protein-Standard-Reihe bei 4°C

Vorgehensweise beim Ansetzen der zu vermessenden Poben:

- zu pipettierende Ansätze in Mikrotiterplatte:

Blank (Leerwert):

100 µL Bradford-Reagenz
10 µL steriles Wasser

Standards:

100 µL Bradford-Reagenz
10 µL verdünnte BSA-Standard-Lösung

Probe:

100 µL Bradford-Reagenz
1 – 10 µL Protein-Lösung
ad 110 µL Wasser

- Inkubation der Ansätze: ca. 15 min
RT
- Beladungsplan der Mikrotiterplatte für den ELISA Reader:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
B	Standard: 0,05µg/µL	Standard: 0,05µg/µL	P 1	P 1	P 8	P 8	P 15	P 15	P 22	P 22	P 29	P 29
C	Standard: 0,1255µg/µL	Standard: 0,1255µg/µL	P 2	P 2	P 9	P 9	P 16	P 16	P 23	P 23	P 30	P 30
D	Standard: 0,25µg/µL	Standard: 0,25µg/µL	P 3	P 3	P 10	P 10	P 17	P 17	P 24	P 24	P 31	P 31
E	Standard: 0,375µg/µL	Standard: 0,375µg/µL	P 4	P 4	P 11	P 11	P 18	P 18	P 25	P 25	P 32	P 32
F	Standard: 0,5µg/µL	Standard: 0,5µg/µL	P 5	P 5	P 12	P 12	P 19	P 19	P 26	P 26	P 33	P 33
G	Standard: 0,625µg/µL	Standard: 0,625µg/µL	P 6	P 6	P 13	P 13	P 20	P 20	P 27	P 27	P 34	P 34
H			P 7	P 7	P 14	P 14	P 21	P 21	P 28	P 28	P 35	P 35

P: Probe

4.16 denaturierende SDS-Gel-Elektrophorese

SDS (Sodiumdodecylsulfat) bewirkt eine Denaturierung der Proteine.

SDS besteht aus einer aliphatischen Kette von 12 C-Atomen mit einer hydrophilen Sulfat-Gruppe. Diese Kette lagert sich entlang der Aminosäurenkette der Proteine an und bildet einen SDS-Protein-Komplex, dessen Oberfläche nach außen gerichtete negative Sulfat-Gruppen aufweist. Somit wird die Eigenladung des Proteins im Vergleich zur negativen Gesamtladung des SDS-Protein-Komplexes vernachlässigbar.

Zur vollständigen Denaturierung von Proteinen müssen bei kovalent verknüpften Protein-Komplexen Disulfid-Brücken (Quartärstrukturen) durch reduzierende Agenzien wie β -Mercaptoethanol oder 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT) gespalten werden. Als Folge werden Protein-Komplexe, die durch elektrostatische Kräfte zusammengehalten werden, in ihre Untereinheiten zerlegt.

Alle Proteine sind damit über ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis vergleichbar geworden: d.h. in einem Gel mit Molekularsieb-Effekt ist die Mobilität eines Proteins proportional zum Logarithmus der relativen Molekülmasse geworden. Damit unterscheiden sich die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine nur noch in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften und werden während der SDS-Gelelektrophorese unabhängig voneinander aufgetrennt.

Bei einer solchen vollständigen Denaturierung geht die enzymatische Aktivität der Proteine verloren.

Die Bandenschärfe bei der Gelelektrophorese wird durch das Auftragevolumen der Probe bestimmt: sie ist direkt proportional zur Füllhöhe der Geltasche. Um auch bei großen Auftragsvolumina scharfe Trennbanden zu erhalten, werden den eigentlichen Trenngelen noch großporige Sammelgele vorgeschaltet. Während im Trenngel wegen der geringen Porengröße der Molekularsieb-Effekt zum Tragen kommt, bleibt er im Sammelgel wirkungslos. Der eigentliche Fokussierungseffekt wird über unterschiedliche Puffer in beiden Gelen bewirkt: Das Trenngel enthält einen Puffer, der sog. Leitionen mit hoher Ionenbeweglichkeit besitzt, das Sammelgel enthält ebenfalls dieses Leition, jedoch bei einem anderen pH-Wert. Dem Laufpuffer wird ein sog. Folgeion zugesetzt, das eine geringe Ionenbeweglichkeit im elektrischen Feld besitzen und pH-abhängig sein muss. Diese Kriterien treffen auf Aminosäuren zu. In der Praxis wird meist Glycin als Folgeion verwendet. Mit Beginn der Elektrophorese werden die Leitionen mit hoher Geschwindigkeit bewegt und überholen die Proteine in der Geltasche und im Sammelgel. Es entsteht eine Zone geringer Leitfähigkeit, da die Dichte an Leitionen in dieser Zone drastisch abnimmt. Die Wahl von Glycin als Folgeion bewirkt nun, dass Proteine mit größerer Geschwindigkeit bewegt werden als die Folgeionen. Dadurch wird eine lokale Feldstärkendifferenz erzeugt, die zu einer Fokussierung der Proteine hinter der Leitionenfront im Sammelgel führt. Durch den pH-Sprung am Übergang von Sammelgel zu Trenngel ändert das Glycin, ein „Zwitterion“, seine Ladung. Die Folge ist eine wesentlich höhere Ionenbeweglichkeit als die der Proteine, die dadurch überholt werden. Im Trenngel herrschen somit für die Proteine konstante Feldstärken und folglich „normale“ Elektrophoresebedingungen in einem konstanten elektrischen Feld. D.h. der Molekularsieb-Effekt der porösen Polyacrylamid-Matrix des Trenngeles trennt die SDS-Protein-Komplexe während ihrer Wanderung durch die Gelmatrix in Richtung Anode nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf.

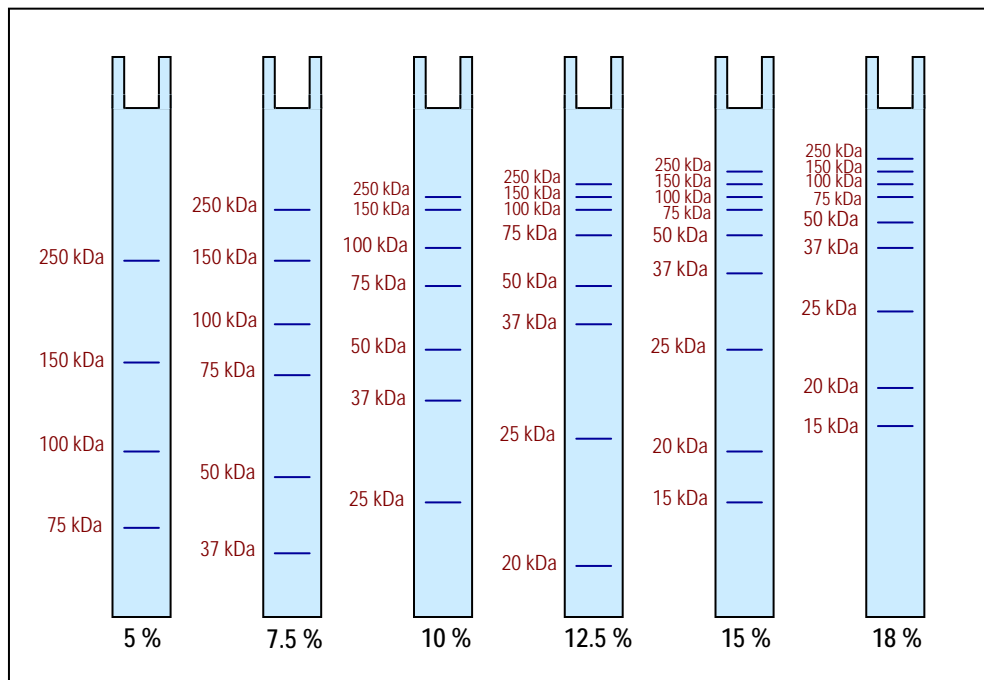


Abbildung 14: Ungefähre Positionen des *Precision Plus Protein™*-Standards von BioRad in Tris-HCl-Polyacrylamid-Gelen verschiedener Acrylamid-Konzentrationen im Trenngel.

Die Molekulargewichte der einzelnen Banden sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Unter jedem Gelstreifen ist die jeweilige Polyacrylamid-Konzentration in Prozent (%) angegeben.
nach „Life Science Research Products“-Katalog 2003/2004 von BioRad

Anhand der obigen Abbildung lässt sich ablesen, mit welcher Polyacrylamid-Konzentration sich welche Größen-Bereiche am besten auftrennen lassen: für Proteine mit 10 – 60 kDa eignen sich 15 % Trenngele, für Proteine mit 30 – 120 kDa verwendet man besser 10 % Trenngele und für Proteine mit 50 – 200 kDa 8 % Trenngele.

Die Trennung von Proteinen bzw. Protein-Fragmenten unter 10 – 15 kDa ist mit dem diskontinuierlichen Gelsystem nicht immer zufriedenstellend. Die Beeinträchtigung der Auflösung begründet sich in der gleichen Wanderungsgeschwindigkeit von kleinen Proteinen und SDS. Deshalb greift man bei Proteinmischungen, die aus sehr kleinen Proteinen und Peptiden mit Molekulargewichten zwischen 1,5 und 10 kDa bestehen, entweder zu 18 % Trenngelen, die 7 – 8 M Harnstoff enthalten oder zu dem Tricin-Gelsystem nach H. Schagger & G. von Jagow (1987). Der Vorteil des Tricin-Systems liegt darin, dass auf den Zusatz von Harnstoff verzichtet werden kann, denn Harnstoff carbamylt Proteine und stört so die Bindung von SDS.

(C. Mühlhardt, 2003)

Es gibt auch Gradientengele, die dann kommen zum Einsatz, wenn ein großer Molekulargewichtsbereich abgedeckt werden soll.

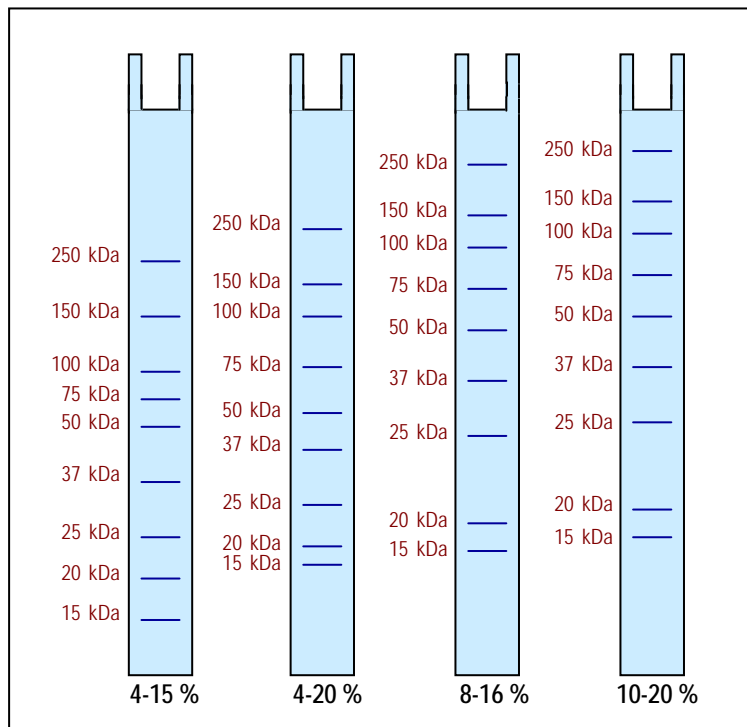


Abbildung 15: Ungefähre Positionen des *Precision Plus Protein*TM-Standards von BioRad in Tris-HCl-Polyacrylamid-Gradientengelen verschiedener Acrylamid-Konzentrationsgradienten im Trenngel.

Die Molekulargewichte der einzelnen Banden sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Unter jedem Gelstreifen ist die jeweilige Polyacrylamid-Konzentration in Prozent (%) angegeben.
nach „Life Science Research Products“-Katalog 2003/2004 von BioRad

benötigte Materialien und Reagenzien für die Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen:

- 30 % Bis-Acrylamid-Lösung
- destilliertes Wasser
- N,N,N',N'-**Tetramethylethylendiamin** (Temed)
- 100 % Isopropylalcohol
- 20 % **Sodiumdodecylsulfat** (SDS)

Herstellung von 20 % (w/v) SDS: SDS 20g/L destilliertes Wasser

- 1 M Tris-HCl (pH 6.8)

Herstellung von 1 M Tris-HCl: Tris 121,1 g/L destilliertes Wasser

- 1 M Tris HCl (pH 8.9)

Herstellung von 1M Tris-HCl: Tris 121,1 g/L destilliertes Wasser

- 10 % **Ammoniumperoxidisulfat** (APS)

Herstellung von 10 % (w/v) APS: APS 5g/15 mL destilliertes Wasser

- Glasplatten
- Glaskolben
- Giessvorrichtung

- 70 % Ethanol zur Reinigung der Glasplatten

Herstellung von 70 % Ethanol: 100 % Ethanol 70 mL/100 mL destilliertes Wasser

Anmerkung: Lagerung der Lösungen bei 4°C, mit Ausnahme von SDS, das ausfallen würde.

Zusammensetzung von SDS-Trenngele unterschiedlicher Bis-Acrylamid-Konzentrationen für die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese:

Die angegebenen Mengen sind für je 2 Minigele von BioRad der Dimension 1 mm x 7.5 cm x 10 cm berechnet.

	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
30 % Bis-Acrylamid	2,50 mL	3,33 mL	4,16 mL	5,0 mL
1 M Tris-HCl (pH 8.9)	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL
20 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µL
H ₂ O _{dest}	3,7 mL	2,87 mL	2,04 mL	1,2 mL
Temed	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
10 % APS	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Zusammensetzung von SDS-Sammelgelen für die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese:

Die angegebenen Mengen sind für 2 Minigele von BioRad der Dimension 1 mm x 7.5 cm x 10 cm berechnet.

	4 %
30 % Bis-Acrylamid	858 µL
1 M Tris-HCl (pH 8.9)	1,068 mL
20 % SDS	30 µL
H ₂ O _{dest}	4,044 mL
Temed	6 µL
10 % APS	60 µL

Vorgehensweise beim Gießen eines SDS-Polyacrylamid-Geles:

- 2 Glasplatten gründlich mit Wasser reinigen und die dem Gel zugewandten Plattenseiten mit Ethanol fuselfrei entfetten
- die Glasplatten zusammenbauen und in die vorgesehene Halterung zum Gießen des Gels einklemmen
- **Gießen des Trenngels:**
 - Zugabe aller Komponenten in Glaskolben
 - gut durchmischen (unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen)
 - ~ 4,5 mL der Mischung zwischen die vorbereiteten Glasplatten pipettieren
 - Überschichten mit ca. 500 µL 100 % Isopropanol
 - Gel gut aushärten lassen
 - Isopropanol-Überstand abgießen und 2-mal mit Wasser nachspülen
 - Bereich über Gel mit Filterpapier trocknen

- **Gießen des Sammelgels:**

- Zugabe aller Komponenten in Glaskolben
- gut durchmischen (unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen)
- ~ 1,5 mL der Mischung zwischen die vorbereiteten Glasplatten pipettieren
- luftblasenfreies Einsetzen des Kammes
- Gel gut aushärten lassen

benötigte Materialien und Reagenzien für den Lauf eines SDS-Polyacrylamid-Gels:

- SDS-Polyacrylamid-Gel (selbstgegossen) oder Tris-HCl-Polyacrylamid-Gradientengel
- 1x Laufpuffer (pH 8.3)

<u>Herstellung von 10x Laufpuffer:</u>	Glycin	144 g
	Tris	30 g
	SDS	10 g

ad 1L destilliertes Wasser

<u>Herstellung von 1x Laufpuffer:</u>	1:10-Verdünnung des 10x Laufpuffers
	100 mL 10x Laemmli- Laufpuffer
	900 mL destilliertes Wasser

- Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur
- *Power Supply*

benötigte Materialien und Reagenzien zur Probenvorbereitung:

- zu analysierende Proteinlösung
- 3x Laemmli-Probenpuffer

<u>Herstellung von 3x Laemmli-Probenpuffer:</u>	1 M Tris-HCl (pH 6.8)	10 mL
	20 % (w/v) SDS	45 mL
	86 % Glycerin	22,8 mL
	DTT	3,85 g
	Bromphenolblau (bis zur gewünschten Farbintensität)	

ad 100 mL destilliertes Wasser

Vorgehensweise bei der Probenvorbereitung:

- Gel in Tank einsetzen
- Tank mit 1x Laufpuffer füllen
- zu analysierende Proteinlösung mit 3x Laemmli-Probenpuffer mischen

WICHTIG:

- 1) Die zu analysierenden Proteinproben dürfen keine Kalium-Ionen enthalten, da es sonst zur Ausfällung von Kalium-Dodecylsulfat kommt.
- 2) Sobald die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer versetzt sind, sofort hitze-denaturieren, da endogene Proteasen, die nicht durch den Proteasen-Inhibitor-Cocktail inhibiert wurden, in SDS-Puffer sehr aktiv sind und schwerwiegende Degradationen hervorrufen.

- Protein-Probenpuffer-Gemisch denaturieren: 100°C
10 min

- Zentrifugation (Abtrennung unlöslicher Bestandteile):
1 min
RT
16 060 g
- Marker und denaturierte Proteinproben aufragen
- Tank mit Deckel schließen
- Elektrophorese-Vorrichtung an *Power Supply* anschließen

Bedingungen für Lauf von Tris-HCl-Minigelen: 35 V
400 mA
150 W
1 h bzw. sobald Bromphenolblau-Bande
den unteren Gelrand erreicht hat

Bedingungen für Lauf von Tris-HCl-Gradienten-Fertiggelen (7 cm x 14 cm): 100 V
400 mA pro Gel
150 W
1 h

- Elektrophorese beenden
- Gel aus der Kammer entnehmen und die Proteine mit der gewünschten Methode (Coomassie Blau Färbung, Silber-Färbung) nachweisen oder Gel zum Transfer der Proteine auf Membranen verwenden.

4.17 Protein-Fixierung im Tris-HCl-SDS-Polyacrylamid-Gel

Vor oder mit dem Färben werden die Proteine im Gel fixiert. Fixierungslösungen entfernen SDS aus dem Gel und verursachen somit ein Verflechten des Proteins in der Gelmatrix. Fixiert wird meistens mit Ethanol/Essigsäure/Wasser-Mischungen, die oft auch gleichzeitig ein Färbemittel wie z.B. Coomassie Blue, enthalten. Hin und wieder wird die Essigsäure durch Trichloressigsäure ersetzt.

(H. Rehm, 2002)

Basische Proteine mit niedrigem Molekulargewicht lassen sich oftmals weder mit Essigsäure- noch mit Trichloressigsäure-Ethanol-Wasser-Gemischen fixieren, und ihre Banden diffundieren im Laufe der Zeit auseinander. Abhilfe schafft in diesen Fällen das Fixieren mit Formaldehyd.

Soll das Gel anschließend mit Silber gefärbt werden, muss das Formaldehyd wieder vollständig auswaschen werden (H. Rehm, 2002).

4.18 Nachweismethode für Proteine im Polyacrylamid-Gel: Coomassie-Blau-Färbung

Das Detektieren von Proteinen in Polyacrylamidgelen ist ein essentieller Schritt bei der Reinigung und Analyse von Proteinen. Die Proteine werden als gefärbte Komplexe nach der Fixierung sowie ihrer Reaktion mit Farbstoffen, Silbersalzen oder auch Fluoreszenzfarbstoffen im Gel lokalisiert.

Bei Proteinmengen oberhalb 1 µg pro Bande empfiehlt sich die Coomassie-Färbung, bei weniger als 1 µg ist die Silberfärbung angebracht. Soll das Protein noch auf eine Membran geblottet werden, so empfiehlt es sich, das Protein entweder mittels Eosin im Gel oder erst nach dem Blotten auf der Membran anzufärben.

(H. Rehm, 2002)

Mit der Coomassie-Blau-Färbung können die Proteine nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamid-Gel fixiert und gleichzeitig angefärbt werden. Dies erfolgt durch Inkubation des Gels in einer Lösung, der ein Triphenylmethan-Textilstoff, Coomassie Brilliant Blue R250 (siehe Abbildung 13) oder Coomassie Brilliant Blue G250 (siehe Abbildung 13), zugesetzt wurde.

(W. Seyffert *et al.*, 1998)

Coomassie Brilliant Blue R-250 ist ein Farbstoff, der unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Coomassie Brilliant Blue G-250 besitzt die gleiche Sensitivität wie R-250, erzeugt aber ein etwas leuchtenderes Blau im Vergleich zum tiefen Blau von R-250, weist eine geringere Löslichkeit auf und wird meist als kolloidale Lösung verwendet. Aufgrund seiner geringen Löslichkeit bindet G-250 präferentiell an die Proteine und nicht an die Gelmatrix, was kürzere Entfärbungszeiten zur Folge hat. Jedoch wird, insbesondere wenn dickere Gelen analysiert werden, oftmals eine geringere Sensitivität beobachtet.

Die Nachweisgrenze für die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 liegt im Bereich von 100 – 200 ng Protein/Bande.

Gegebenenfalls kann mit einer Methanol/Essigsäure-Lösung das Gel auch wieder entfärbt werden. Der Farbstoff diffundiert dann aus dem Gel, bleibt aber an den Stellen, an denen sich Protein in Gel befindet, haften.

Die hier verwendete *Bio-SafeTM*-Coomassie Blue G-250-Färbelösung ist eine vorgemischte Lösung, bei der auf die Verwendung von Methanol und Essigsäure bei der Färbung verzichtet werden kann. Die Färbelösung ergibt blaue Banden ohne starke Hintergrundfärbung. Die Sensitivität liegt bei ≥ 8 ng.

Das Entfärben erfolgt in Wasser.

(„Bio-SafeTM Coomassie Stain Brochure“, BioRad)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- *Bio-SafeTM*-Coomassie Blue G-250-Färbelösung, ready-to-use
- Plastikschale

Vorgehensweise:

- Gel für 3x 5 min wässern
- nach dem letzten Waschschrift: Wasser komplett entfernen
- Zugabe von 50-100 mL Bio-Safe Coomassie Blue G-250-Färbelösung
- Inkubation: ~ 1 h (bis gewünschte Bandenfärbung)
RT
Taumelschüttler
- gefärbtes Gel für 30 min wässern
- Fotografieren des Gels auf einem Weißlichttisch

4.19 Western Blot & Immunfärbung

Beim Protein-Blotting, dem sog. Western Blot, werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung zuerst elektrophoretisch in einem Gel aufgetrennt (siehe 4.16), dann auf eine Protein-bindende Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für bestimmte Proteine der getrennten Mischung spezifisch ist.

4.19.1 Western Wet Blot

Der Transfer auf eine Membran erfolgt immer senkrecht zur Trennrichtung, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran exakt dem Trennmuster des Gels entspricht.

Das Standardverfahren im Protein-Blotting ist der elektrophoretische Transfer, bei dem die Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine Membran überführt werden. Zur Durchführung des elektrophoretischen Transfers gibt es zwei Verfahren: der *Wet*- oder *Tank*-Blot und der *Semi-Dry*-Blot. Wichtig für das Gelingen eines Proteinblots ist die richtige Blottingmembran. Grundsätzlich sind alle Membranmaterialien geeignet, die zur Bindung von Proteinen befähigt sind. Die Bandbreite erstreckt sich von Nitrocellulose (NC), Polyvinylidendifluorid (PVDF) über Nylon bis hin zu Polypropylen und diazitiertem Papier. Durchgesetzt haben sich Nitrocellulose und PVDF, sowie in eingeschränktem Maße Nylon.

PVDF besitzt eine sehr hohe Bindekapazität für Proteine, eine gute Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln, eine hohe Reißfestigkeit und ein gutes Signal/Hintergrund-Verhältnis mit Chemilumineszenz-Detektionssystemen. Deshalb können Proteinblots auf PVDF auch zur Proteinsequenzierung verwendet werden. Die hohe Proteinbindekapazität der PVDF kann allerdings auch von Nachteil sein, wenn der Blot nur unzureichend abgesättigt wurde. Generell gilt: je höher die Bindekapazität einer Membran, desto stärker ist die Tendenz zu unspezifischen Hintergrundreaktionen mit dem Nachweisreagenz. PVDF zeigt daher manchmal einen höheren Hintergrund als Nitrocellulose. Darüber hinaus muss PVDF vor Verwendung erst mit Methanol benetzt werden. Auch können SDS-haltige Transferpuffer mit der Protein-Bindung interferieren.

Für die Wahl des Transferpuffers gibt es zahlreiche Alternativen, was darauf zurückzuführen ist, dass die Pufferzusammensetzung für einen erfolgreichen Transfer nicht kritisch ist (H. Gültekin *et al.*, 1988). Der Puffer darf nur kein Natriumchlorid oder andere gut leitende Salze enthalten, da dies zu sehr hohen Strömen führt, was wiederum einen schlechten Transfer und eine Überhitzung von Blot und Apparatur zu Folge hat. Auch muss kein exakter pH-Wert für den Transferpuffer eingehalten werden. Vielmehr ist darauf zu achten, dass sich der pH-Wert des Transferpuffers vom isoelektrischen Punkt des zu transferierenden Proteins unterscheidet. Der pH-Wert der meisten Transferpuffer liegt im Bereich von 7.3 – 11 (H. Towbin *et al.*, 1979). Nur bei *Semi-Dry*-Blot-Apparaturen mit Graphitelektroden sollte der pH-Wert 8.5 nicht übersteigen, um eine Beeinträchtigung der Elektroden zu vermeiden.

Ein Methanolgehalt im Transferpuffer von bis zu 20 % dient dazu das Benetzen der Membran zu erleichtern und die Bindung der Proteine an SDS zu lockern, was wiederum ihre Bindung an die PVDF- oder Nitrocellulosemembran verbessert (G. Jacobson *et al.*, 1990). Allerdings kann in methanolhaltigen Puffern das Gel etwas schrumpfen und damit den Transfer von hochmolekularen Proteinen verschlechtern. Darüber hinaus wird in einem solchen methanolhaltigen Puffer, insbesondere bei Glykoproteinen, die Bindung von SDS an die

Proteine so sehr gelockert, dass letztendlich schlechtere Transferraten als mit methanolfreiem Puffer erzielt werden.

benötigte Materialien, Geräte und Reagenzien:

- Vertikal-Wet-Blotting-Apparatur
- 100 % Methanol für PVDF-Membran
- Hybond-PVDF-Membran
- Whatman 3MM-Papier
- 1x Transferpuffer (pH 8.3)

Herstellung von 10x Transferpuffer:

Glycin	144 g
Tris	30 g

ad 1L destilliertes Wasser

Herstellung von 1x Transferpuffer:

10x Transferpuffers	100 mL
100 % Methanol	200 mL
destilliertes Wasser	700 mL

- *Power Supply*
- Magnetrührer
- Rührfisch
- Kühlakku

Vorgehensweise:

- Schwämmchen gut in 1x Transferpuffer einweichen
- PVDF-Membran in 100 % Methanol einlegen
- 1 Schwämmchen auf ein Gitterteil legen
- 2 Whatman-Papiere in 1x Transferpuffer tränken und luftblasenfrei auf das Schwämmchen legen
- PVDF-Membran luftblasenfrei auf die Whatman-Papiere legen
- Sammelgel von Trenngel abschneiden
- Trenngel luftblasenfrei auf Membran legen
- 2 Whatman-Papiere in 1x Transferpuffer tränken und luftblasenfrei auf das Trenngel legen
- 1 Schwämmchen auf die Whatman-Papiere legen
- Gitterteil schließen
- Gitterteil in Blot-Gerät einsetzen
- **WICHTIG:** Gitterteil so einsetzen, dass die Membran zu Anode (+) und das Gel zu Katode (-) zeigt.
- Blot-Gerät auf Magnetrührer stellen
- Kühlakku einsetzen
- 1x Transferpuffer in Blot-Gerät füllen (Gitterteil muss vollständig bedeckt sein)
- Rührfisch zugeben und Magnetrührer anschalten
- Tank mit Deckel schließen

- Vertikal-Wet Blot-Apparatur an *Power Supply* anschließen

<u>Bedingungen für Blot von Tris-HCl-Minigelen:</u>	100 V 500 mA 150 W 1 h
<u>Bedingungen für den Blot von Tris-HCl-Gradienten-Fertiggelen (7 cm x 14 cm):</u>	100 V 1 000 mA 150 W 1 h

- Blot aus der Kammer entnehmen und die Membran wie nachfolgend beschrieben weiter behandeln (siehe 4.19.2, 4.19.3 und 4.19.4).

4.19.2 Färbung der transferierten Proteine zur Überprüfung der Blot-Effizienz via Ponceau S-Färbung

Die Effizienz des Transfers kann mit Hilfe von Färbereagenzien, die generell Proteine anfärben, überprüft werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Anfärbung nicht mit der nachfolgenden Nachweisreaktion interferiert. Weit verbreitet ist die hier angewandte Methode der Anfärbung mit dem roten Farbstoff Ponceau S (Salinovich *et al.*, 1986). Ponceau S bietet den Vorteil, dass die Anfärbung nicht permanent und daher mit den meisten Nachweisreaktionen und Visualisierungsverfahren kompatibel ist. In der Regel ist die Färbung schon nach mehrfachem Waschen und dem Absättigen (Blocken) der Membran wieder verschwunden. Darüber hinaus ist der Färbevorgang kaum zeitaufwendig. Sie ist zwar nicht so sensitiv wie kolloidale Metalle wie etwa kolloidales Gold, aber für die Routinekontrolle der Transfereffizienz die kostengünstige, wenig zeitaufwendige und völlig ausreichende Alternative.

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Ponceau S-Lösung, ready-to-use
- Plastischale
- 1x TBST-Waschpuffer (pH 8.0)

Herstellung von 10x TBST-Waschpuffer:

Tris	12,1 g einwiegen, in 500 mL destilliertem Wasser lösen und pH 8.0 einstellen
NaCl	87,6 g
Tween 20	5 mL

ad 1L destilliertes Wasser

Herstellung von 1x TBST-Waschpuffer:

1:10-Verdünnung des 10x TBST-Waschpuffers
100 mL 10x TBST-Waschpuffer
900 mL destilliertes Wasser

Vorgehensweise:

- Membran in Plastischale legen (Protein-Seite nach oben)
- Ponceau S-Lösung zugeben

- Inkubation: RT
Taumelschüttler

sobald Marker- bzw. sobald Proteinbanden sichtbar werden:

Farbstofflösung abgießen und die Markerbanden mit Kugelschreiber auf der Membran anzeichnen

- 3-maliges Waschen:
Zugabe von 1x TBST-Waschpuffer
Inkubation: 20 min
RT
Taumelschüttler

4.19.3 Blocken

Das Blocken dient dazu, die restlichen, unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Blotmembran vor der Reaktion mit Antikörpern, Lektinen oder Proteinliganden mit einem Blocker abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien und damit unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden. Die gängigsten Blockmittel sind BSA, entfettetes Milchpulver, Casein, fötales Kälber- oder Pferdeserum, Ovalbumin, Serumalbumin, Tween 20 und Gelatine.

Blots, die nur mit Tween 20 geblockt wurden, zeigen eine hohe Hintergrundfärbung und unspezifische Banden bei der Immunfärbung. Aber Tween 20 ergänzt gut andere Blocker wie BSA. Allerdings darf die Tween 20-Konzentration nicht zu hoch sein, da Tween 20 teilweise Proteine vom Blot wieder ablöst.

Blocker, die für Nylonmembranen gut sind, eignen sich auch für PVDF-Membranen. Das Blocken von ⁺Nylonmembranen dagegen muss unter rabiaten Bedingungen erfolgen: 1 % Hämoglobin bzw. 10% BSA in PBS bei 45°C über Nacht (J. M. Gershoni *et al.*, 1982).

benötigte Materialien und Reagenzien:

- 5 % Milchpulver_{in 1x TBST}

Herstellung von 5 % Milchpulver: Milchpulver 5g/100 mL 1x TBST

- 1x TBST-Waschpuffer (pH 8.0)

Herstellung von 10x TBST-Waschpuffer:

Tris	12,1 g einwiegen, in 500 mL destilliertem Wasser lösen und pH 8.0 einstellen
NaCl	87,6 g
Tween 20	5 mL

ad 1L destilliertes Wasser

Herstellung von 1x TBST-Waschpuffer:

1:10-Verdünnung des 10x TBST-Waschpuffers
100 mL 10x TBST-Waschpuffer
900 mL destilliertes Wasser

- Plastischale

Vorgehensweise:

- die in 1x TBST gewaschene Membran in Plastischale legen ([Protein-Seite nach oben](#))

- Zugabe von 5 % Milchpulver_{in 1x TBST}
- Inkubation: 1 h
RT
Taumelschüttler
- 3-maliges Waschen:
Zugabe von 1x TBST-Waschpuffer
Inkubation: 20 min
RT
Taumelschüttler

4.19.4 Bindung der Erst- und Zweit-Antikörper & Visualisierung über Chemilumineszenz-Reaktion

Nach dem Blocken der Membran erfolgt als eigentliche Nachweisreaktion die Bindung des Erst-Antikörpers an eines der transferierten Proteine. Dieser Erst-Antikörper ist in der Regel nicht sichtbar, so dass zur Visualisierung des Signals die Bindung eines Zweit-Antikörpers an den Erst-Antikörper notwendig ist. Ein solcher Zweit-Antikörper stammt aus einer anderen Spezies als der Erst-Antikörper. Er ist gegen konstante Bereiche des Erst-Antikörpers gerichtet und an Enzyme wie Meerrettichperoxidase (**H**orse **R**adish **P**eroxidase, HRP) oder Alkalische Phosphatase (AP), an Radionuklide oder Fluoreszenzfarbstoffe konjugiert, über die die Bindung später sichtbar gemacht wird. Durchgesetzt hat sich vor allem die indirekte Visualisierung über Enzym-Markierung, da dabei weder radioaktiver Problemabfall anfällt, noch ein hoher apparativer Aufwand wie bei einem Fluorophor-Nachweis nötig ist. Ein weiterer Vorteil der Enzym-Markierung besteht darin, dass ein Enzymmolekül eine Vielzahl von Substratmolekülen umsetzt und so das Signal noch mal verstärkt. Bei der Enzym-Markierung liefert das Enzym durch Zugabe des entsprechenden Substrates entweder ein gefärbtes (Farbreaktion) oder ein Licht emittierendes Produkt (Chemilumineszenz), welches am Ort seiner Entstehung ausfällt bzw. Licht ausstrahlt und so die Position der Proteine sichtbar macht.

benötigte Materialien und Reagenzien:

- 1x TBST-Waschpuffer (pH 8.0)
Herstellung von 10x TBST-Waschpuffer :

Tris	12,1 g einwiegen, in 500 mL destilliertem Wasser lösen und pH 8.0 einstellen
NaCl	87,6 g
Tween 20	5 mL

ad 1L destilliertes Wasser

Herstellung von 1x TBST-Waschpuffer: 1:10-Verdünnung des 10x TBST-Waschpuffers
100 mL 10x TBST-Waschpuffer
900 mL destilliertes Wasser
- 5 % Milchpulver_{in 1x TBST} für Verdünnung des Sekundär-Antikörpers
Herstellung von 5% Milchpulver: Milchpulver 5g/100 mL 1x TBST
- 3 % BSA_{in 1x TBST} für die Verdünnung des Primär-Antikörpers
Herstellung von 3 % BSA: BSA 3g/100 mL 1x TBST

- Primär-Antikörper
- Sekundär-Antikörper, HRP-konjugiert
- 1x TBS-Waschpuffer (pH 8.0)

Herstellung von 10x TBS-Waschpuffer:

0.1M Tris	12,1 g einwiegen, in 500 mL destilliertem Wasser lösen und pH 8.0 einstellen
1.5M NaCl	87,6 g

ad 1L destilliertes Wasser

Herstellung von 1x TBS-Waschpuffer:

1:10-Verdünnung des 10x TBS-Waschpuffers
 100 mL 10x TBS-Waschpuffer
 900 mL destilliertes Wasser

- Entwicklungsreagenz *CHEMIGLOW™ West Substrate*
- Saranfolie
- Plastikschalen
- 50 mL-Greiner-Röhrchen

Vorgehensweise:

- die in 1x TBST gewaschen Membran in Plastikschale legen ([Protein-Seite nach oben](#))
- Primär-Antikörper entsprechend in 3 % BSA_{1x TBST}-Lösung verdünnen

Antikörper-Konzentrationen und ihre einzusetzenden Verdünnungen:
 (siehe 3.4 Antikörper)

Volumen für ein Minigel (7.5 cm x 10 cm): 5 mL in 50 mL-Greiner-Röhrchen

Volumen für gr. Gel (7 cm x 14 cm): 25 mL in 14 cm x 19 cm-Schale

- Membran in Antikörper-BSA-Lösung einlegen ([Protein-Seite nach oben](#))
- Inkubation: 1 h bei RT **oder** über Nacht bei 4°C
 Kipp-/Rollenmischer bzw. Taumelschüttler
- Antikörper-BSA-Lösung abgießen
- 3-maliges Waschen:
 Zugabe von 1x TBST-Waschpuffer
 Inkubation: 20 min
 RT
 Kipp-/Rollenmischer bzw. Taumelschüttler
- Sekundär-Antikörper entsprechend in 5 % Milchpulver_{1x TBST}-Lösung verdünnen

Antikörper-Konzentrationen und ihre einzusetzenden Verdünnungen:
 (siehe 3.4 Antikörper)

Volumen für ein Minigel (7.5 cm x 10 cm): 5 mL in 50 mL-Greiner-Röhrchen

Volumen für gr. Gel (7 cm x 14 cm): 25 mL in 14 cm x 19 cm-Schale

- Membran in Antikörper-Milchpulver-Lösung einlegen ([Protein-Seite nach oben](#))
- Inkubation: 1 h bei RT
 Kipp-/Rollenmischer bzw. Taumelschüttler
- Antikörper-Milchpulver-Lösung abgießen

- 3-maliges Waschen:
Zugabe von 1x TBS-Waschpuffer
Inkubation: 20 min
RT
Kipp-/Rollenmischer bzw. Taumelschüttler
- *ChemiGlow*TM-Reagenzien mischen:
1 mL *Chemiglow*TM WEST Luminol/Enhancer Solution
1 mL *Chemiglow*TM WEST Stable Peroxide Solution
- Membran in Plastischale legen (Protein-Seite nach oben)
- Zugabe des *Chemiglow*TM-Gemisches
- Inkubation: 5 min
RT
durch ständiges Pipettieren den Blot mit dem *Chemiglow*TM-Gemisch benetzt halten
- Membran am ChemImager entwickeln

4.20 Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurde von Kary B. Mullis (K. Mullis *et al.*, 1986) entwickelt. Sie stellt eine *in vitro*-Technik dar, mit deren Hilfe gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, enzymatisch vervielfältigt werden können.

Das grundlegende Prinzip der PCR-Methode ist die vielfache Wiederholung eines Teilschrittes, bei der eine Kopie der beiden ursprünglichen DNA-Einzelstränge synthetisiert wird, vorausgesetzt, man kennt zumindest einen Teil der betreffenden Nukleotidsequenz. Zunächst wird der bekannte Teil der Sequenz zur Synthese von zwei DNA-Oligonukleotiden eingesetzt, deren Basenabfolge jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge komplementär ist und die an entgegengesetzten Punkten der Region liegen, die vermehrt werden soll. Diese Oligonukleotide dienen als Primer für die *in vitro*-DNA-Synthese, die von dem Enzym *Taq*-DNA-Polymerase (siehe Seite 91) katalysiert wird. Außerdem bestimmen sie auch die Enden des DNA-Fragmentes, das man schließlich erhält. Als Matrize (*Template*) dient die hitzedenaturierte einzelsträngige DNA (oder cDNA von mRNA), an die sich die Oligonukleotidprimer anlagern. Ausgehend von deren freien 3'-OH-Enden synthetisiert die *Taq*-DNA-Polymerase dann in 5'→3'-Richtung einen zur Matrize komplementären Strang. Als Bausteine für den neu synthetisierten Strang dienen die vier Nukleotide in Form von Desoxyribonukleosidtriphosphaten. Am Ende der Reaktion liegen alle DNA-Moleküle als Doppelstränge vor. Um diese Synthese zu wiederholen, muss die doppelsträngige DNA erneut durch Hitze denaturiert werden, so dass die Primer nach Abkühlung wieder binden können. Sobald dann wieder die richtige Temperatur für die Enzymreaktion erreicht ist, verlängert die *Taq*-DNA-Polymerase die Primer erneut. Der Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Polymerisation (Verlängerung) wird mehrmals wiederholt. Dabei findet in jedem Zyklus eine Verdopplung des vorhandenen Matrizenmaterials statt, d.h. die gewünschte DNA-Sequenz wird exponentiell vermehrt (siehe Abbildung 17). In der Praxis genügen meist 20–30 Reaktionszyklen, um eine ausreichende DNA-Menge zu erhalten.

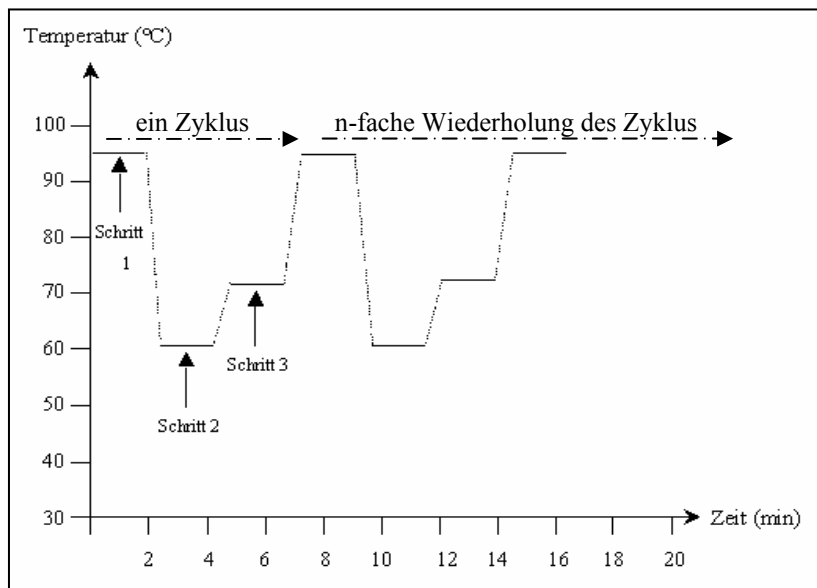


Abbildung 16: Zyklischer Temperaturverlauf einer PCR.

Schritt 1: Thermische Denaturierung des Templates bei 94 °C. Schritt 2: Abkühlen auf Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotidprimer. Erst dann können die Oligonukleotide an die denaturierte Matrize binden. Schritt 3: Erhöhung auf Temperaturoptimum der *Taq*-DNA-Polymerase. Sie verlängert in Gegenwart der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's) die Primer.

Durch Automatisierung des Verfahrens dauert es nur wenige Stunden, um ein DNA-Fragment zellfrei zu klonieren. Im Gegensatz dazu würde ein normaler Klonierungsvorgang mehrere Tage dauern.

Die Entwicklung einer vollautomatischen PCR-Maschine ergab sich aus der Verwendung einer speziellen DNA-Polymerase, die ursprünglich aus dem extrem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wurde (daher auch der Name *Taq*-Polymerase) und mittlerweile aus rekombinanten *Escherichia coli*-Bakterien isoliert wird. Die *Taq*-DNA-Polymerase weist ein Reaktionsoptimum bei 75 – 80°C auf, wohingegen ihre Polymeraseaktivität bei ca. 37 °C etwa um den Faktor 10 reduziert ist. Da diese Polymerase wiederholt auch bei einer Temperatur oberhalb von 90 °C nicht denaturiert und inaktiviert wird, ist es möglich, die Polymerase-Kettenreaktion in einem periodisch heiz- und kühlbaren Metallblock zyklisch durchzuführen, ohne bei jedem neuen Zyklus neue Polymerase zugeben zu müssen.

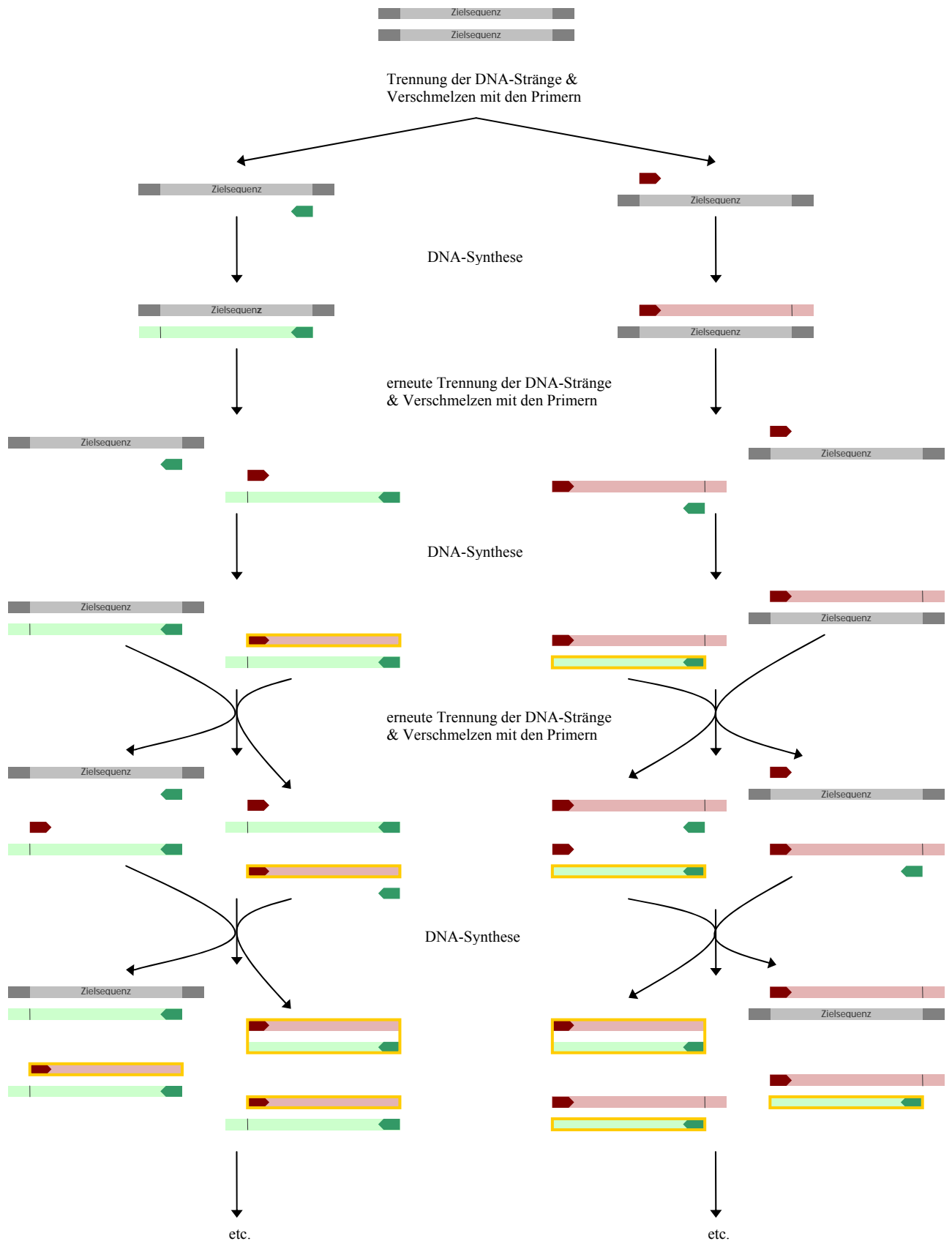


Abbildung 17: Schema einer PCR-Vermehrung.

Hier ist als Beispiel dargestellt, daß drei Zyklen 16 DNA-Ketten produzieren, von denen 8 die Zielsequenz X aufweisen. Doch schon nach drei weiteren Zyklen wären 240 von 256 DNA-Ketten genau X Nukleotide lang.
 grüner Pfeil: Primer sense; roter Pfeil: Primer antisense; gelb markiert: Zielsequenz mit X Nukleotiden.
 B. Alberts *et al.*, „Molekularbiologie der Zelle“ (1995)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- 10x PCR-Puffer mit 25 mM MgCl₂
- 10 mM dNTP-Mix
 - 10 mM dNTP-Mix enthält:
 - 10 mM ATP
 - 10 mM CTP
 - 10 mM TTP
 - 10 mM GTP
- *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/μL)
- steriles Wasser (Firma Braun)
- *Forward*- und *Reverse*-Primer (10 pmol/μL)
 - verwendete Primer-Paare und deren Sequenzen: siehe 3.11
- Template-DNA (~100 ng/μL)
- autoklavierte PCR-*Stripes*

Vorgehensweise beim Ansetzen eines 100 μL-PCR-Ansatzes:

- 78,4 μL steriles Wasser
- 10 μL 10x MgCl₂-haltigen PCR-Puffer
- 2 μL 10 mM dNTP-Mix
- 4 μL *Template*-DNA
- 2 μL *Forward*-Primer
- 2 μL *Reverse*-Primer
- 1,6 μL *Taq*-DNA-Polymerase (als letztes zugeben)
- vorsichtig mischen
- in PCR-Cycler stellen und entsprechendes Programm starten
 - verwendete PCR-Programme: siehe 10.1
- Überprüfung der PCR in einem Agarosegel (Agarosegelelektrophorese: siehe 4.11)
jeweils 5 μL PCR-Produkt einsetzen

4.21 Zellkultur von *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Zellen

Die Sf9-Zellen stammen von Insekten, aus den Ovarien des Puppenstadiums von *Spodoptera frugiperda*, einem Eulenfalter (siehe Abbildung 10). Diese Zellen lassen sich wie Säugerzelllinien *in vitro* kultivieren, haben aber einen anderen Anspruch an die Kulturbedingungen. Aufgrund ihrer Herkunft vom poikilothermen Tier liegt die optimale Kultivierungstemperatur bei diesen *Lepidopteren*-Zelllinien um 27,5°C und das pH-Optimum bei 6.2. Die Kulturmedien sind in der Regel der Insektenhaemolymphe nachempfunden, enthalten eine um ca. zehnmal höhere Aminosäurekonzentration als vergleichbare Medien für die Säugerzellkultur und haben ein nahezu ausgeglichenes Natrium/Kalium-Verhältnis. Ein weiterer Unterschied zur Säugerzellkultur besteht darin, dass die Aminosäure Histidin und als Puffersubstanzen Phosphatpuffer (und kein Bicarbonat-Puffersystem wie bei Säugerzellen) verwendet werden. Sf9-Zellen können sowohl als Monolayer als auch in Suspension kultiviert werden.

4.21.1 Auftauen von kryo-konservierten Sf9-Zellen

benötigte Materialien und Reagenzien:

- kryokonservierte Sf9-Zellen (ca. 1×10^7 Zellen)
- vorgewärmtes Zellmedium *Ex-CellTM 400*
- sterile T75-Zellkulturflasche aus Polystyrol mit Filter-Schraubverschluss und hydrophilisierter Oberfläche
- sterile Einweg-Pipetten
- Pipettierhilfe

Vorgehensweise:

- Zugabe von 10 mL vorgewärmtem Medium in T75-Zellkulturflasche
- Zellen auftauen lassen
- Zugabe der aufgetauten Zellen
- Inkubation zum Adaptieren der Zellen: 1 h
27°C-Brutschrank
- Abnahme des Medium-Überstandes (zur Entfernung toter, nicht adaptierter Zellen)
- Zugabe von 10 mL frischem, vorgewärmtem Medium
- Inkubation: bis etwa 80 % Konfluenz erreicht
27°C-Brutschrank

4.21.2 (Sub-)Kultivierung von Sf9

Kultivierte Zellen benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung einen regelmäßigen Wechsel des Kulturmediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums einschließlich aller Zusätze entweder von den Zellen metabolisiert werden oder im Laufe der Zeit zerfallen. Zudem sammeln sich Ausscheidungs- und Stoffwechselprodukte im Medium an, die ebenfalls das Wachstum und die Vitalität verschlechtern. Auch aufgrund der Kontaktinhibierung ist eine Subkultivierung nötig.

Im Regelfall sollte man deswegen bei etwa einer Konfluenz von ca. 80% subkultivieren.

4.21.2.1 Sub-Kultivierung von Sf9-Monolayer-Kulturen

benötigte Materialien und Reagenzien:

- vorgewärmtes Zellmedium *Ex-CellTM 400*
- sterile Einweg-Pipetten
- sterile T-Zellkulturflasche aus Polystyrol mit Filter-Schraubverschluss und hydrophilisierter Oberfläche
- Pipettierhilfe

Vorgehensweise bei Erreichen von etwa 80 % Konfluenz:

- Klopfen oder Schlagen an die (Unter-)Seite der Kulturflasche
- Zellen 1:3 – 1:7 verdünnt mit frischem, vorgewärmtem Medium in neuer Kulturflasche aussäen
- Inkubation: bis Flasche etwa 80 % konfluent
27°C-Brutschrank

4.21.2.2 (Sub-)Kultivierung von Sf9-Suspensionskulturen

Die Zellzahl sollte bei Insektenzellen so eingestellt werden, dass die Zelldichte pro mL 10^5 Zellen nicht unterschreitet.

benötigte Materialien und Reagenzien:

- vorgewärmtes Zellmedium *Ex-CellTM 400*
- sterile Spinnerflasche
- sterile Einweg-Pipetten
- Pipettierhilfe
- Magnetrührer

Vorgehensweise:

- Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (siehe 4.21.3)
- gewünschte Menge an Zellen entnehmen und in neue Spinnerflasche pipettieren *oder* gewünschte Zellmenge in der Spinnerflasche lassen und nur die überschüssigen Zellen entnehmen
- Zugabe der entsprechenden Menge an frischem, vorgewärmten Medium
- Inkubation: 27°C-Brutschrank
ca. 270 rpm

4.21.3 Vitalfärbung von Zellen mittels Trypanblau & anschließende Zellzahlbestimmung mittels Häemocytometer

Für Routineuntersuchungen auf Vitalität von Zellen haben sich Tests bewährt, die davon ausgehen, dass bei lebenden Zellen bestimmte Farbstoffe (geladen und/oder $M_r > 200$) nicht in das Zellinnere gelangen können, während tote Zellen sich mit dem betreffenden Farbstoff anfärben. Der am meisten verbreitete Test auf Lebensfähigkeit von Zellen ist der Trypanblau-Färbetest, der als Routinetest eingesetzt wird.

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann. Die Farbstoffaufnahme der Zellen ist stark pH-abhängig. Die maximale Aufnahmefähigkeit findet bei pH 7.5 statt. Weitere relativ kritische Faktoren sind Temperatur, Färbedauer und Farbstoffkonzentration. Bei diesem Test ist zu berücksichtigen, dass möglichst ohne Serumzusatz im Medium gearbeitet werden sollte, da sich die Anzahl der gefärbten Zellen bei

zunehmender Serumkonzentration drastisch vermindert und deshalb eine vorhandene Lebensfähigkeit vortäuschen kann.

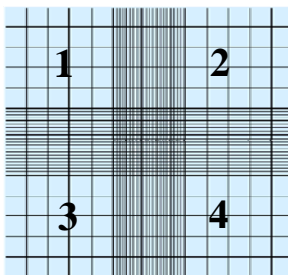
benötigte Materialien und Reagenzien:

- Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer mit Deckglas)
- Probe der Zellsuspension
- Trypanblau-Lösung (1:8 verdünnt in 1x PBS)
- 1.5 mL-Eppendorftubes
- sterile Einweg-Pipetten
- Pipettierhilfe

Vorgehensweise:

- Deckglas auf Zählkammer legen
- Probe von der Zellsuspension entnehmen
- Ansatz pipettieren:

700 µL Trypanblau	}	gut durchmischen
100 µL gut durchmischte Zellsuspension		
- Zählkammer mit der Trypanblau-Zellsuspension füllen
(Flüssigkeit sollte nur den vorgegebenen Raum füllen)
- Zählkammer unter das Mikroskop legen
10x-Vergrößerung einstellen (Phasen-Kontrast)
- 2x 4 große Quadrate auszählen
(Zellen, die auf den Außenlinien liegen, werden mitgezählt, wobei nur 2 der 4 Außenlinien gezählt werden.)



- Berechnung der Zellzahl:

$\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Zellzahl} \times \frac{1}{\text{Anzahl gezählter Quadrate}} \times 10^4 = \text{Anzahl Zellen / mL}$ <p style="text-align: center;">(hier: Faktor 8)</p>

4.22 Zellkultur von HeLa-Zellen

Die HeLa-Zelllinie war die erste menschliche Zelllinie, von der eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Die HeLa-Zellen wurden 1951 aus Gewebe eines menschlichen vermeintlichen Zervix-Karzinoms (Gebärmutterkrebs) isoliert. Eine spätere Diagnose ergab ein Adeno-Karzinom. „HeLa“ leitet sich vom Namen der 31-jährigen afroamerikanischen Patientin, **Henrietta Lacks**, ab.

Inzwischen gibt es Varianten der HeLa-Zellen, die sich z.B. in der Morphologie, in der Virusempfindlichkeit und der Chromosomenzahl voneinander unterscheiden.

HeLa-Zellen sowie ihre davon abgeleiteten Zelllinien besitzen unbegrenzte Fähigkeit zur Zellteilung, lassen sich relativ leicht in Zellkultur halten und haben sich daher zu einem eukaryontischen Standardsystem für biochemische, molekularbiologische und genetische Untersuchungen entwickelt sowie in der Virologie vor allem zur Züchtung von Adeno-, Pocken-, Mumps, Influenza B- und Poliomyelitis-Viren verwendet.

(DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; www.roempp.com)

Danksagung:

Dr. Jeremy Simpson (EMBL Heidelberg) für die Kultivierung der HeLa-Zellen für die Co-Lokalisationsstudien und Immunpräzipitationen.

4.23 Transfektion von HeLa-Zellen mit dem „FuGENE 6 Transfection Reagent“ von Roche Molecular Biochemicals

Als Transfektion wird allgemein der Prozess des Einbringens von Fremd-DNA in Zellen bezeichnet (siehe auch 4.13.1). Die DNA-Transfektion ist ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Genfunktion und Genregulation. Zu den ersten, gebräuchlichsten Transfektionstechniken gehören die Kalziumphosphat-Copräzipitation, die Elektroporation und die Verwendung viraler Vektoren. Eine Erweiterung der üblichen Transfektionstechniken waren die von kationischen Liposomen vermittelten Methoden wie Lipofektion und Zytofektion. Weitere Klassen von Transfektions-vermittelnden Verbindungen sind Lipopolyamine und Dendrimere.

„FuGENE 6“ ist ein Mehr-Komponenten-, nicht-liposomales, Lipid-basiertes Transfektionsreagenz aus Lipiden und anderen Komponenten in 80% Ethanol. Das Reagenz komplexiert mit DNA und bringt so die DNA während der Transfektion in die Zelle.

benötigte Materialien und Reagenzien:

- raumtemperiertes *Opti-MEM*[®] I-Medium, Serum-reduziert
- zu transfizierende DNA
- autoklavierte 1.5 mL-Eppendorftubes
- raumtemperiertes Transfektionsreagenz *FuGENE 6*

Vorgehensweise:

- am Vortag: HeLa-Zellen so aussäen, dass sie am Tag der Transfektion etwa 50 % konfluent sind

für Immunfluoreszenz: Deckgläschen (Ø 15 mm) in Ø 3 cm-Schalen

für Lebendpräparat: *Life Cell Dishes*

für Co-Immunpräzipitation: Ø 10 cm-Schalen

- entsprechende DNA-Menge in 1.5 mL-Eppendorftube vorlegen
 - für Immunfluoreszenz: 0.5 µg DNA
 - für Lebendpräparat: 1 µg DNA
 - für Co-Immunpräzipitation: 8 µg DNA
- entsprechende Menge Transfektionsreagenz *FuGENE 6* und Medium vorsichtig mischen und zur vorgelegten DNA zugeben
 - für Immunfluoreszenz: 50 µL Medium + 1.5 µL *FuGENE 6*
 - für Lebendpräparat: 100 µL Medium + 3 µL *FuGENE 6*
 - für Immunpräzipitation: 16 mL Medium + 24 µL *FuGENE 6*
- Inkubation: 20 min
RT
- tropfenweise Zugabe des Transfektionsansatzes zu den am Vortag ausgesäten HeLa-Zellen
- Inkubation: 24 h
37°C-Brutschrank
5 % CO₂-Begasung
95 % rel. Luftfeuchtigkeit

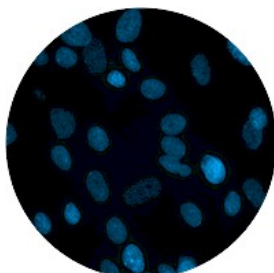
4.24 Nachweis von Mykoplasmen mittels „VenorGeM PCR-Kit“ von Minerva Biolabs

Die mit dem Trivialnamen „Mykoplasmen“ beschriebenen Mikroorganismen der Klasse *Mollicutes* umfassen mehr als 150 verschiedene Spezies.

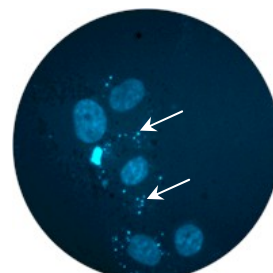
Mykoplasmen besitzen keine Zellwand und sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten. Sie sind in ihrer Form variabel und ihre Größe schwankt zwischen 0,22 µm und 2 µm. Damit sind sie so klein, dass sie Bakterien-Filter passieren können. Die geringe Größe geht mit einem sehr kleinen Genom einher. Mykoplasmen können nicht alle zum Wachstum benötigten Nährstoffe synthetisieren und leben deshalb parasitisch mit Wirtszellen. Zellkulturen bieten Mykoplasmen zwangsläufig ideale Lebensbedingungen (Nährstoffe im Überfluss, optimale Temperaturen).

Kontaminationen von Zellkulturen mit Mykoplasmen sind relativ häufig, lang andauernd und meist schwierig zu behandeln, aber dank neuer Methoden zumindest leicht zu identifizieren. Mykoplasmen-Kontaminationen bewirken nicht immer dramatischen Effekte und bleiben deshalb lange unentdeckt, obwohl sie vielfältig in den Stoffwechsel der befallenen Zellen eingreifen.

Mykoplasmen-negative Zellkultur



Mykoplasmen-positive Zellkultur



Der VenorGeM[®]-Mykoplasmen-Diagnostikkit ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest auf der Basis der Polymerase-Kettenreaktion. Die PCR-Methode erlaubt eine schnelle und sehr sensitive Detektion von Mykoplasmen-Kontaminationen in biologischen Proben.

Die mitgelieferten Primer erlauben der DNA-Polymerase die Verfielfältigung eines Abschnittes der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 280 Basenpaaren und kann direkt in einem Agarosegel sichtbar gemacht werden. Das gewählte *Template* ist innerhalb der Spezies *Mycoplasma* hochkonserviert, zeigt aber auch deutliche Sequenzhomologien zum Genom von *Acholeplasma laidlawii* und verschiedenen Ureaplasmen. Mit diesem Kit können daher neben den typischerweise als Kontaminanten in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmen-spezies *M. orale*, *M. hyorhinae*, *M. arginini*, *M. salivarium* und *M. hominis* auch *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. synoviae* und verschiedene Ureaplasmen-Spezies detektiert werden. Das Testsystem beinhaltet außerdem eine interne Kontrolle, die in jedem PCR-Ansatz mitgeführt werden kann. Diese Kontrolle liefert in einer erfolgreich durchgeführten PCR ein ca. 191 Basenpaar-großes Produkt.

(Gebrauchsinformation „VenorGeM[®]-Mykoplasmen-Detektionskit für die konventionelle PCR“, Minerva Biolabs)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- VenorGeM[®]-Mykoplasmen-Diagnostikkit mit folgenden Komponenten:
 - Primer/Nukleotid-Mix
= lyophilisierte Primer und Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP
 - 10x MgCl₂-haltiger PCR-Puffer
 - Positiv-Kontrolle
= DNA-Fragmente des *Mycoplasma orale*-Genoms
 - Interne Kontrolle
= Plasmid mit den mycoplasmen-spezifischen Primersequenzen und einer internen Sequenz des HTLV I *tax* Gens mit einer Größe von 191 Basenpaaren
- sterile PCR-Reaktionsgefäße
- Taq-DNA-Polymerase (5 U/μL)
- steriles Wasser (Firma Braun)
- sterile 1.5 mL-Eppendorftubes

Vorgehensweise beim Ansetzen der 50 μL-PCR-Ansätze:

- 100 μL Probenmaterial (z.B. Zellkulturüberstand) in 1.5 mL-Eppendorftube geben
- 5 min aufkochen
- Zentrifugation: 5 sec
RT
16 060 g
- DNA-haltigen Überstand abnehmen
- PCR-Ansätze pipettieren:
 - 35,8 μL steriles Wasser
 - 5 μL 10x MgCl₂-haltiger PCR-Puffer
 - 5 μL Primer/Nukleotid-Mix
 - 2 μL *Template*-DNA (Proben-Überstand bzw. Positiv-Kontrolle)
 - 2 μL Interne Kontrolle
 - 1,6 μL Taq-DNA-Polymerase (als letztes zugeben)

- vorsichtig mischen
- in PCR-Cycler stellen und entsprechendes Programm starten
verwendete PCR-Programme: siehe 10.1
- Überprüfung der PCR in 1.5 % Agarosegel (Agarosegelelektrophorese siehe 4.11)
jeweils 5 µL PCR-Produkt einsetzen

Interpretation der möglichen Bandenmuster nach erfolgreicher PCR:

	Bandenmuster	Interpretation
Interne Kontrolle	191 bp	PCR hat funktioniert
Positiv-Kontrolle	265-278 bp	Kontamination mit Mycoplasmen
Zellkultur-Probe	191 bp UND schwache Bande bei 270 bp	schwache Mykoplasmen-Kontamination
Zellkultur-Probe	starke Bande bei 270 bp (191 bp-Bande der Internen Kontrolle nicht mehr sichtbar)	starke Mykoplasmen-Kontamination

4.25 Immunfluoreszenz

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine effektive Methode der Lichtmikroskopie zur Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle. Mit dieser Technik kann nicht nur die subzelluläre Lokalisation eines Proteins bestimmt werden, sondern es können auch die Änderung der Lokalisierung als Antwort der Zelle auf bestimmte Stimuli hin untersucht werden und die relative Lokalisierung mehrerer Proteine verglichen werden. Unter Verwendung bestimmter Techniken können Proteine sowohl in fixierten als auch in lebenden Zellen nachgewiesen werden.

Das Prinzip der Fluoreszenz beruht darauf, dass fluoreszierende Stoffe durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden und dann Licht einer anderen Wellenlänge emittieren. Bei der Anregung werden Elektronen aus dem Grundniveau auf ein höheres Energieniveau angehoben. Unter Emission von Licht gelangen die angeregten Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Diese Eigenschaft nutzt man aus, indem man bestimmte Stoffe mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) markiert und so in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar macht.

Fluorochrome besitzen meist eine Anordnung konjugierter Doppelbindungen in aromatischen Ringsystemen. Beispiele für Fluorochrome sind Carbocyanine (Cy3, Cy5), FITC oder Alexa Fluor.

Um bestimmte Komponenten einer Zelle (Proteine oder andere Makromoleküle) mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, werden in der Regel fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, die spezifisch an die entsprechenden Substanzen (Antigene) binden. Daher auch der Name Immunfluoreszenz.

Man unterscheidet die direkte und die indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung bindet ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Primärantikörper direkt an das Antigen der Zelle und wird mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Bei der überwiegend verwendeten indirekten Immunfluoreszenzmethode bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper (Sekundärantikörper) eingesetzt, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist.

Diese Methode der indirekten Immunfluoreszenz erlaubt mehr Flexibilität, da eine Vielzahl von Primärantikörpern mit den gleichen markierten Sekundärantikörpern kombiniert werden kann (Kostenersparnis).

Für die Immunfluoreszenzfärbung müssen die Zellen in der Regel fixiert werden. Dies soll gewährleisten, dass das Antigen fixiert und so ein Auswaschen verhindert wird, dass die Zelle permeabilisiert wird und der Antikörper damit Zugang zum Antigen hat, dass das Antigen in einer für den Antikörper erkennbaren Form bleibt und dass die Zellstruktur aufrechterhalten bleibt.

Es gibt unterschiedliche Fixative, wobei die Auswahl von dem jeweiligen Antigen bzw. Antikörper abhängig ist. Organische Lösungsmittel wie Methanol und Aceton lösen hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Proteinstruktur auf und fällen so die Proteine aus (präzipitierende Fixative). Strukturelle Epitope können jedoch durch diese Fixierung zerstört werden. Sog. quervernetzende Substanzen wie Paraformaldehyd und Glutaraldehyd bilden intermolekulare Netzwerke (meist zwischen freien Aminogruppen) aus und schaffen somit ein „Netzwerk“ von verbundenen Proteinen. Solche vernetzende Fixative erhalten in der Regel den Gewebekontext besser, können jedoch Proteine durch die Quervernetzung unzugänglich machen. Darüber hinaus macht eine Fixierung mit (Para-)Formaldehyd die Membran für Antikörper nicht durchlässig, so dass eine zusätzliche Behandlung mit nicht-ionischen Detergenzien zur Permeabilisierung nötig ist.

Die Fluoreszenzmikroskopie ist auch für lebende, nicht fixierte Zellen geeignet. Diese Technik bedient sich der Vorteile von natürlich fluoreszierender Proteine wie CFP (**C**yan **F**luorescent **P**rotein), YFP (**Y**ellow **F**luorescent **P**rotein) oder GFP (**G**reen **F**luorescent **P**rotein; stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria*). Das Gen für ein solches Fluoreszenzprotein kann an das Gen eines anderen Proteins fusioniert werden. Zellen, in die diese rekombinante DNA eingeschleust wurde, synthetisieren das entsprechende Fusionsprotein und die Lokalisierung dieses Proteins in der Zelle kann anhand der Fluoreszenz detektiert werden.

4.25.1 Zellfixierung mittels Methanol und anschließende Antikörpermarkierung

benötigte Materialien und Reagenzien:

- eiskaltes 100 % Methanol
- eiskalter 1x PBS
- raumtemperierter 1x PBS
- Primärantikörper
- Sekundärantikörper, Fluoreszenzfarbstoff-markiert
- Mowiol
- Glas- oder Metallplatte
- Parafilm
- Objektträger
- 6-well-Platten

Vorgehensweise:

- in 6-*well*-Platte 2 mL eiskaltes 100% Methanol vorlegen
- Deckgläschen mit den Zellen in das vorgelegte Methanol überführen
- Inkubation: 4 min
-20°C
- Absaugen des Methanols
- Zugabe von 2 mL eiskaltem 1x PBS
- Absaugen des 1x PBS
- erneute Zugabe von 2 mL eiskaltem 1x PBS
- Absaugen des 1x PBS
- Glas- oder Metallplatte mit Parafilm bespannen
- in raumtemperiertem 1x PBS verdünnten Primärantikörper in genügend weitem Abstand auf die mit Folie bespannte Platte pipettieren (60 µL-Tropfen)
- Deckgläschen mit den fixierten Zellen nach unten luftblasenfrei auf den Primärantikörper-Tropfen legen
- Inkubation: 30 min
RT
abgedunkelt
- in 6-*well*-Platte 2 mL raumtemperierten 1x PBS vorlegen
- Deckgläschen in den vorgelegten raumtemperierten 1x PBS überführen
- Absaugen des 1x PBS
- erneute Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 1x PBS
- Glas- oder Metallplatte mit neuem Parafilm bespannen
- in raumtemperiertem 1x PBS verdünnten Sekundärantikörper in genügend weitem Abstand auf die mit Folie bespannte Platte pipettieren (60 µL-Tropfen)
- Deckgläschen mit den fixierten Zellen nach unten luftblasenfrei auf den Sekundärantikörper -Tropfen legen
- Inkubation: 30 min
RT
abgedunkelt
- in 6-*well*-Platte 2 mL raumtemperierten 1x PBS vorlegen
- Deckgläschen in den vorgelegten raumtemperierten 1x PBS überführen
- Absaugen des 1x PBS
- erneute Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 1x PBS
- je 7.5 µL Mowiol auf Objektträger tropfen
- Deckgläschen mit den Zellen nach unten luftblasenfrei auf den Mowiol-Tropfen legen
- Deckgläschen trocknen lassen (über Nacht bei RT *oder* 1h bei 37°C)
- Betrachtung der Präparate unter dem Mikroskop

4.25.2 Zellfixierung mittels Paraformaldehyd und anschliessende Antikörpermarkierung

benötigte Materialien und Reagenzien:

- 3.5 % Paraformaldehyd
- raumtemperierter 1x PBS

- raumtemperierter 1x PBS mit 30 mM Glycin
Herstellung von 1x PBS mit 30 mM Glycin: Glycin 2,25 g/L 1x PBS
- raumtemperiertes 1x PBS mit 0.1% TritonX-100
Herstellung von 1x PBS mit 0.1% Triton X-100: Triton X-100 1 mL/L 1x PBS
- Primärantikörper
- Sekundärantikörper, Fluoreszenzfarbstoff-markiert
- Mowiol
- Glas- oder Metallplatte
- Parafilm
- Objektträger
- 6-well-Platten

Vorgehensweise:

- in 6-well-Platte 2 mL 3.5 % Paraformaldehyd vorlegen
- Deckgläschen mit den Zellen in das vorgelegte Paraformaldehyd überführen
- Inkubation: 20 min
RT
- Absaugen des Paraformaldehyds
- Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 1x PBS_{30 mM Glycin}
- Inkubation: 5 min
RT
- Absaugen des 1x PBS_{30 mM Glycin}
- Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 1x PBS
- Absaugen des 1x PBS
- erneute Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 1x PBS
- Absaugen des 1x PBS
- Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 1x PBS_{0.1 % TritonX-100}
- Inkubation: 5 min
RT
- Absaugen des 1x PBS_{0.1 % TritonX-100}
- Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 1x PBS
- Absaugen des 1x PBS
- erneute Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 1x PBS
- Glas- oder Metallplatte mit Parafilm bespannen
- in raumtemperiertem 1x PBS verdünnten Primärantikörper in genügend weitem Abstand auf die mit Folie bespannte Platte pipettieren (60 µL-Tropfen)
- Deckgläschen mit den fixierten Zellen nach unten luftblasenfrei auf den Primärantikörper-Tropfen legen
- Inkubation: 30 min
RT
abgedunkelt
- in 6-well-Platte 2 mL raumtemperierten 1x PBS vorlegen
- Deckgläschen in den vorgelegten raumtemperierten 1x PBS überführen
- Absaugen des 1x PBS
- erneute Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 1x PBS

- Glas- oder Metallplatte mit neuer Parafilm bespannen
- in raumtemperiertem 1x PBS verdünnten Sekundärantikörper in genügend weitem Abstand auf die mit Folie bespannte Platte pipettieren (60 µL-Tropfen)
- Deckgläschen mit den fixierten Zellen nach unten luftblasenfrei auf den Sekundärantikörper-Tropfen legen
- Inkubation: 30 min
RT
abgedunkelt
- in 6-well-Platte 2 mL raumtemperierten 1x PBS vorlegen
- Deckgläschen in den vorgelegten raumtemperierten 1x PBS überführen
- Absaugen des 1x PBS
- erneute Zugabe von 2 mL raumtemperiertem 1x PBS
- je 7.5 µL Mowiol auf Objektträger tropfen
- Deckgläschen mit den Zellen nach unten luftblasenfrei auf den Mowiol-Tropfen legen
- Deckgläschen trocknen lassen (über Nacht bei RT *oder* 1h bei 37°C)
- Betrachtung der Präparate unter dem Mikroskop

4.26 nicht-denaturierende Co-Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Methode der **Immunpräzipitation** (IP) kann ein bestimmtes Protein inklusive seines Interaktionspartners aus der Vielzahl der Proteine und Protein-Protein-Komplexe eines Zelllysates isoliert werden, und so die Frage klären, ob zwei (oder mehrere) Proteine *in vivo* miteinander vergesellschaftet sind. Außerdem wird die Methode oft auch zur Identifizierung neuer Interaktionspartner eines bestimmten Proteins eingesetzt.

Das Prinzip einer Co-Immunpräzipitation lässt sich folgendermaßen beschreiben (siehe Abbildung 18): Wenn Protein X mit einem gegen sich gerichteten Antikörper immunpräzipitiert wird, dann wird Protein Y, das mit Protein X *in vivo* stabil assoziiert ist, mitpräzipitiert (Komplex 1). Diese Präzipitation von Protein Y, basierend auf einer physikalischen Interaktion mit Protein X, wird als Co-Immunpräzipitation bezeichnet.

Voraussetzung für die Detektion einer Interaktion mit dieser Methode ist, dass die Protein-Protein-Interaktion nicht nur unter den (nicht-denaturierenden) Lysebedingungen erhalten bleibt, sondern auch über eine Reihe von Waschschritten hinweg stabil ist. Aus diesem Grund ist diese Methode eher für Proteine, die nach der Solubilisierung aus der Zelle in physiologischen Komplexen fortbestehen, geeignet, als für schwache und nur vorübergehende (transiente) Interaktionen, die in der Zelle in einem Zustand des dynamischen Gleichgewichtes existieren.

Es sind aber auch einige „Fallstricke“ zu beachten, wie etwa „künstliche“ Interaktion aufgrund der Zerstörung der subzellulären Kompartimentierung (siehe Abbildung 18: Komplex 2) oder unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Proteinen im Zelllysate (siehe Abbildung 18: Komplex 3) (E. Golemis *et al.*, 2002)

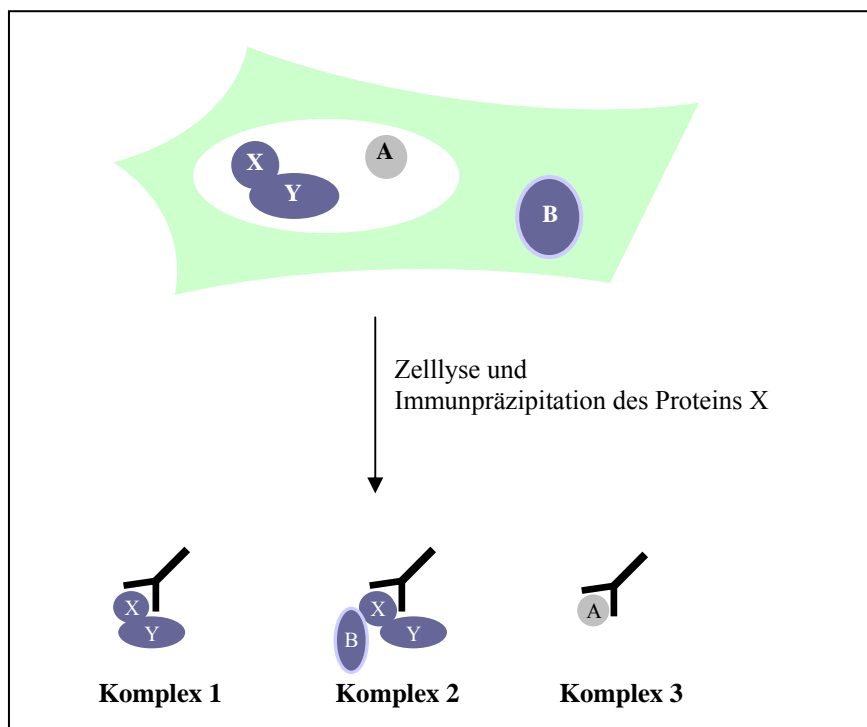


Abbildung 18: Prinzip und „Fallstricke“ bei der Detektion von Proteinen über Co-Immunpräzipitation.

Komplex 1: In intakten Zellen liegt Protein X in einem Komplex mit Protein Y vor. Der Komplex bleibt auch nach der Zelllyse erhalten und erlaubt so die Co-Immunpräzipitation von Protein Y mit Protein X. **Komplex 2:** Durch Zerstörung der subzellulären Kompartimentierung kann es zu „künstlichen“ Interaktionen zwischen einigen Proteinen (z.B. Protein X und Protein B) kommen. **Komplex 3:** Unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers, der bei der Immunpräzipitation verwendet wird, mit anderen Proteinen (z.B. Protein A).
E. Golemis *et al.*, „A Molecular Cloning Manual: Protein-Protein-Interactions“ (2002) (Adapted from: Sambrook and Russell, Molecular Cloning, 2001)

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Transfektionsansätze vom Vortag
nicht-transfizierte Platte als Kontrolle
- raumtemperierter 1x PBS
- gekühlter IP-Lysepuffer (pH 8.0)

<u>Herstellung von IP-Lysepuffer:</u>	NaCl	0.87 g
	Tris-HCl	0.61 g
	NP 40	1 mL
ad 100 mL destilliertes Wasser		
	Protease-Inhibitoren	10 Tabletten
	PMSF	1,74 g

- Zellschaber
- sterile 1.5 mL-Eppendorftubes
- 50 % Protein A-Sepharose
- Immunpräzipitations-Antikörper
- IP-Waschpuffer: 1x PBS mit 0.1% NP 40

Herstellung von IP-Waschpuffer: NP 40 1 mL/L 1x PBS

- 3x Laemmli-Probenpuffer

Herstellung von 3x Laemmli-Probenpuffer:

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	10	mL
20 % (w/v) SDS	45	mL
86 % Glycerin	22,8	mL
DTT	3,85	g
Bromphenolblau (bis zur gewünschten Farbintensität)		

ad 100 mL destilliertes Wasser

Vorgehensweise:

- Medium von den Zellen absaugen
- Zellen 3-mal mit raumtemperiertem 1x PBS waschen
- Zugabe von 0.5 mL kaltem IP-Lysepuffer
- Inkubation: 10 min
4°C
- Zellen abschaben
Bei mehreren gleichen Transfektionsansätzen: Lysate poolen und alle Platten abschließend noch einmal mit einem einzigen 0.5 mL-Aliquot des IP-Lysepuffers waschen und zum Pool dazugeben.
- Zentrifugation des Lysates: 5 min
RT
16 060 g
- proteinhaltigen Überstand in 1.5 mL-Eppendorftube überführen
- Vorklärung des Lysates (Entfernung der IgG's):
Zugabe von 100 µL 50 % Protein-Sepharose A pro 1 mL Lysat
Inkubation: 1 h
4°C
auf Rotator
- Zentrifugation: 3 min
RT
3 345 g
- Überstand in 1.5 mL-Eppendorftube überführen
- Zugabe von 5 – 10 µg Immunpräzipitations-Antikörper
(Als Kontrolle: Probe ohne AK-Zugabe)
- Inkubation: über Nacht
4°C
auf Rotator
- Zugabe von 50 µL 50 % Protein-Sepharose A
- Inkubation: 2 h
4°C
auf Rotator
- Zentrifugation: 3 min
RT
3 345 g
- Sepharose-Pellet 5-mal mit IP-Waschpuffer waschen
- Zentrifugation: 3 min
RT
3 345 g

- Zugabe von 15 μ L 3x Laemmli-Probenpuffer
Proben 10 min bei 95°C aufkochen
- Zentrifugation: 5 min
RT
16 060 g
- Überstand auf SDS-Gel auftragen und Western Blot-Analyse machen (siehe 4.16 und 4.19)

4.27 Yeast-Two-Hybrid-Assay

Das von Fields und Song entwickelte sog. Two-Hybrid-System weist eine Protein-Protein-Wechselwirkung in intakten Zellen ausschließlich auf genetischer Basis nach. Normalerweise werden dazu Hefezellen verwendet.

Das Two-Hybrid-System basiert auf der biologischen Wirkung bestimmter eukaryontischer Transkriptionsfaktoren, die aus zwei Domänen bestehen: einer Aktivierungs-Domäne und einer DNA-bindenden Domäne. Die DNA-bindende Domäne interagiert mit einer spezifischen *Upstream-Aktivatorsequenz* (UAS) der DNA und positioniert den Transkriptionsfaktor damit in die Nähe einer Transkriptionseinheit oder eines Promotors. Die Bindung dieses Proteins an die DNA ist notwendig, aber nicht ausreichend für seine Funktion. Der auf der DNA fixierte Transkriptionsfaktor nimmt nun mit Hilfe seiner Aktivierungsdomäne Kontakt mit dem basalen Transkriptionsapparat auf und löst die Transkription aus. Aktivierungsdomänen haben kein besonders auffälliges Struktur-Merkmal, sind aber häufig sauer, d.h. enthalten oft überdurchschnittlich viele saure Aminosäuren wie z.B. Aspartat oder Glutamat. Die Spezifität dieser Aktivierung wird offenbar allein durch die DNA-Bindung reguliert, denn die Aktivierungsdomäne kann beispielsweise mit Hilfe molekulargenetischer Techniken mit einer DNA-Bindungsdomäne anderer Spezifität fusioniert werden und aktiviert dann prompt alle Gene, deren Umgebung von der DNA-Bindungsdomäne „rekrutiert“ wurden. Wenn aber die DNA-Bindung durch Mutationen in der Bindungsdomäne zerstört ist oder die Aktivierungsdomäne von der Bindungsdomäne getrennt wird, geht auch die Funktion der Aktivierungsdomäne verloren. Die separate Expression dieser einzelnen Funktionsmodule in einer Zelle kann also keine Transkription auslösen, da die DNA-Bindungsdomäne kein Aktivierungspotential besitzt und die Aktivierungsdomäne nicht in der Nähe des Reportergens binden kann. Diese Eigenschaften der beiden Domänen – funktionale Komplementarität und Modularität – erlaubten die Entwicklung der Two-Hybrid-Technik, eines genetischen Systems zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Wenn man allerdings diese zwei Module mit zwei Proteinen oder Protein-Domänen (X und Y) fusioniert, die miteinander interagieren können, wird eine ideale Voraussetzung für die Funktion der Transkriptionsfaktors geschaffen: die Kopplung der für die Funktion notwendigen Module, die DNA-Bindungsdomäne und die Aktivierungsdomäne (siehe Abbildung 19). Die Wirkung des auf diese Weise rekonstruierten Transkriptionsfaktors ist also direkt abhängig von der Interaktion dieser Proteine.

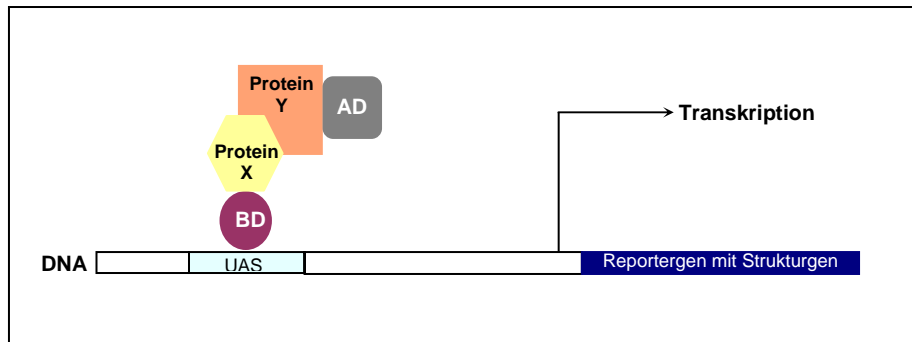


Abbildung 19: Das Prinzip des Two-Hybrid-Systems.

Die funktionalen Domänen eines Transkriptionsfaktors, die DNA-Bindungsdomäne (BD) und Aktivierungsdomäne (AD), werden als zwei Fusionsproteine (Protein X und Y) exprimiert. Die Funktion des Transkriptionsfaktors, die Aktivierung der Transkription eines Gens, wird wieder hergestellt, wenn die beiden Fusionsproteine über die zusätzlichen Proteinanteile interagieren.

Als Reportergen wird oft das lacZ-Gen aus *Escherichia coli* verwendet, das für das Enzym Beta-Galaktosidase kodiert. Beta-Galaktosidase setzt den Indikator X-Gal (= 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid) zu einem blauen Produkt um (siehe Abbildung 20). So lassen sich Hefezellen, in denen das Reportergen aktiviert wurde, leicht an ihrer Färbung identifizieren, wenn sie auf diesem Substrat ausplattiert werden.

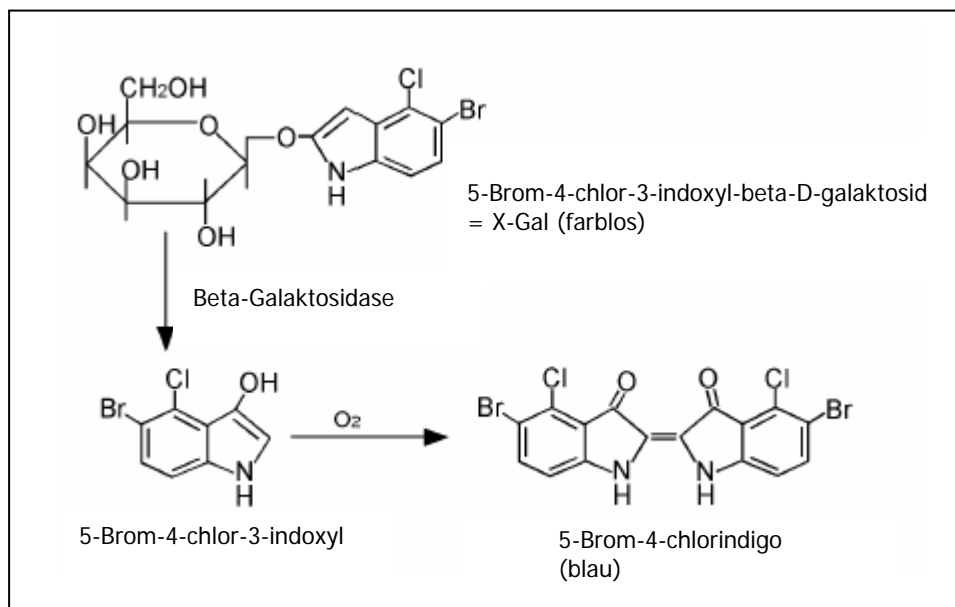


Abbildung 20: Das Enzym Beta-Galactosidase katalysiert die Umsetzung von farblosem X-Gal zu blauem 5-Brom-4-chlorindigo.

β-Galaktosidase spaltet das farblose X-Gal, wobei 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl freisetzt wird. Das so enzymatisch abgespaltene Indoxyl wird zum blauen, unlöslichen Indigo (5-Brom-4-chlorindigo) oxidiert.

Zusätzlich werden oft noch Reportergen-Konstrukte in das Genom des Hefestamms integriert, der als Wirt für den Vorgang dient, z.B. das Gen HIS3 (kodiert für die Imidazolacetolphosphat-Transaminase) und das Gen URA3 (kodiert für Orotidine-5'-phosphat-Decarboxylase). Durch diese weiteren Reportergene wird zusätzlich zum Screening-Kriterium „Blaufärbung“ noch ein Selektionskriterium „Proliferation“ eingeführt.

4.27.1 Hefe-Co-Transformation

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Agarplatte mit Kolonien des entsprechend benötigten Hefe-Stammes:

Hefe: *Saccharomyces cerevisiae*

„Andi-Stamm“ ⇒ Einzel-Transformation von pBTM116- bzw. pACT2-Klonen ODER Co-Transformation

L40cc Mata [Mat α *his 3 Δ 200 trp1-901 leu2-3, 112 LYS2::(*lexAop*)₄-HIS3TATA-HIS3 ura3:: (*lexAop*)₈-GAL1TATA-lacZ ADE2:: (*lexAop*)₈-GAL1TATA-URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2*]

- Herings-Sperma = Carrier-DNA
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- 96-well-Replikatorstempel
- Nylon-Membran
- sterile 1.5 mL-Eppendorftubes
- 96-well-Mikrotiterplatte
- sterile 14 mL-Rundbodenröhrchen
- DNA der Interaktionspartner
(sowohl als *preys* in Vektor pACT2, als auch als *bait*s in Vektor pBTM116-D9)
- Mix I → Löchrigmachen der Hefe-Zellwand

<u>Herstellung von Mix I:</u>	1 M LiAc	1 mL
	10x TE	0.5 mL
	2 M Sorbitol	5 mL

ad 10 mL destilliertes Wasser

<u>Herstellung von 1 M Lithiumacetat:</u>	LiAc	13.198 g/200 mL destilliertes Wasser
---	------	--------------------------------------

<u>Herstellung von 10x TE:</u>	Tris	12.11 g
	EDTA	3.722 g

ad 1 L destilliertes Wasser

<u>Herstellung von 2 M Sorbitol:</u>	Sorbitol	27.868 g/200 mL destilliertes Wasser
--------------------------------------	----------	--------------------------------------

- Mix II → Plasmid-Aufnahme

<u>Herstellung von Mix II:</u>	1 M LiAc	1.5 mL
	10x TE	1.5 mL
	60 % PEG	10 mL

ad 15 mL destilliertes Wasser

<u>Herstellung von 1 M Lithiumacetat:</u>	LiAc	13.198 g/200 mL destilliertes Wasser
---	------	--------------------------------------

<u>Herstellung von 10x TE:</u>	Tris	12.11 g
	EDTA	3.722 g

ad 1 L destilliertes Wasser

<u>Herstellung von 60 % Polyethylenglycol:</u>	PEG	60 mL/100 mL destilliertes Wasser
--	-----	-----------------------------------

- 100x Aminosäure-Stocklösungen

Herstellung von 100x Aminosäure-Stocklösung: siehe 3.9

- SD2-Agarplatten mit folgender Aminosäurezusammensetzung:
 - Leucin
 - Tryptophan
 - + Histidin
 - + Uracil

Herstellung von SD2-Agarplatten: Difco Bac Agar 10 g/200 mL destilliertes Wasser

autoklavieren
 Zugabe von Difco Nitrogen-Base-Medium 200 mL

in Mikrowelle aufkochen
 abkühlen lassen
 Zugabe der benötigten 100x Aminosäuren je 5 mL

Herstellung von Difco Nitrogen-Base-Medium: Difco Nitrogen Base 3,4 g
 50 % Glycerin 50 mL
 50 mL 5 M Betain **oder** 30 g Betain

ad 500 mL destilliertes Wasser

Herstellung von 5 M Betain: Betain 58.55 g/100 mL destilliertes Wasser

- SD2-Medium

Herstellung von SD2-Medium: Difco Nitrogen Base 3,4 g
 50 % Glycerin 50 mL
 50 mL 5 M Betain **oder** 30 g Betain

ad 500 mL destilliertes Wasser
 autoklavieren

Zugabe von 40 % Glucose 25 mL
 Zugabe der benötigten 100x Aminosäuren je 6 mL

Herstellung von 5 M Betain: Betain 58.55 g/100 mL destilliertes Wasser

Herstellung von 50 % Glycerin: 86 % Glycerin 285 mL/500 mL destilliertes Wasser

Herstellung von 40 % Glucose: Glucose 200 g/500 mL destilliertes Wasser

- SD4-Agarplatten (enthalten keine Aminosäuren)

Herstellung von SD4-Agarplatten: Difco Bac Agar 10 g/200 mL destilliertes Wasser

autoklavieren
 Zugabe von Difco Nitrogen-Base-Medium 200 mL

in Mikrowelle aufkochen
 abkühlen lassen

Herstellung von Difco Nitrogen-Base-Medium: Difco Nitrogen Base 3,4 g
 50 % Glycerin 50 mL
 50 mL 5 M Betain ODER 30 g Betain

ad 500 mL destilliertes Wasser
 autoklavieren

Herstellung von 5 M Betain: Betain 58.55 g/100 mL destilliertes Wasser

Herstellung von 50 % Glycerin: 86 % Glycerin 285 mL/500 mL destilliertes Wasser

- **Yeast-Peptone-Dextrose-Medium (pH 5.8) mit 2 % Glucose**

<u>Herstellung von YPD-Medium:</u>	Pepton	20 g
	Hefe-Extrakt	10 g

ad 950 mL destilliertes Wasser
autoklavieren
Zugabe von 50 mL 40 % Glucose

Herstellung von 40 % Glucose: Glucose 200 g/500 mL destilliertes Wasser

- autoklaviertes 1x TE

<u>Herstellung von 100x TE:</u>	Tris	12,11 g
	EDTA	3,7 g

ad 100 mL destilliertes Wasser
autoklavieren

Herstellung von 1x TE: 1:100-Verdünnung des 100x TE-Puffers
10 mL 100x TE-Puffer
900 mL destilliertes Wasser

Vorgehensweise:

- am Vorabend stationäre Über-Nacht-Vorkultur animpfen:
50 mL YPD+Glc_{2%Endkonz.}
einige Kolonien von Agarplatte mit entsprechendem Hefestamm abkratzen
- Inkubation: über Nacht
30°C-Schüttelinkubator
200 rpm
- Medium mit stationärer Über-Nacht-Vorkultur animpfen:
28 mL YPD+Glc_{2%Endkonz.}
3 mL der Über-Nacht-Vorkultur
- Inkubation: bis Zelldichte OD₆₀₀ ~ 0,8
30°C-Schüttelinkubator
200 rpm
- Zentrifugation: 5 min
RT
836 g
- ÜS verwerfen
- Zellpellet waschen:
in 10 mL 1x TE resuspendieren
Zentrifugation: 5 min
RT
2000 rpm
- ÜS verwerfen
- Permeabilisierung der Hefe-Zellwand:
Zellpellet in 1 mL Mix I resuspendieren
Inkubation: mind. 10 min
RT

- Co-Transformationsansätze pipettieren im 1.5 mL-Eppendorftube: (Reihenfolge beachten)
 - 5 µL Herings-Sperma
 - 3 µL Aktivator-DNA
 - 3 µL Bindungs-DNA
 - 40 µL Hefesuspension
 - 230 µL Mix II
- Inkubation der Transformationsansätze: 30 min
30°C
- Zugabe von 30 µL DMSO/Transformationsansatz
- Hitzeschock:
 - 7 min
 - 42°C-Thermomixer
 - 800 rpm
- Ausplattieren des gesamten Transformationsansatzes auf SD2-Agarplatte
- Inkubation: 30°C-Brutschrank
 - bei Einfach-Transformation: 2-3 Tage
 - bei Co-Transformation: 4-5 Tage
- in sterile 14 mL-Rundbodenröhrchen 2 mL SD2-Medium vorlegen
einige Kolonien mit Impföse abnehmen und das SD2-Medium animpfen
WICHTIG: Medium muss beim Animpfen schon leicht trübe sein, da Hefen in Flüssigmedium nur schwer anwachsen.
- Inkubation: ca. 24 h
30°C-Schüttler
200 rpm
- Stempeln der Kulturen auf Agarplatten und Membranen für Beta-Galactosidase-Test:
je 150 µL der Kulturen in 96-well-Mikrotiterplatte überführen
 - 3x auf gleiche Stelle auf SD2-Agarplatte stempeln
 - 3x auf gleiche Stelle auf Membran auf SD2-Agarplatte stempeln
 - 3x auf gleiche Stelle auf SD4-Agarplatte stempeln
 - 3x auf gleiche Stelle auf Membran auf SD4-Agarplatte stempeln
- Inkubation: 30°C-Brutschrank
 - bei SD2: 4-5 Tage
 - bei SD4: 7 Tage

4.27.2 Beta-Galactosidase-Test

benötigte Materialien und Reagenzien für den Beta-Galactosidase-Test:

- Z-Puffer (pH 7.0)

<u>Herstellung des Z-Puffers:</u>	Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	5.4 g
	Na ₃ H ₂ PO ₄ • H ₂ O	2.8 g
	KCl	0.4 g
	MaCl • 7 H ₂ O	0.12 g
ad 500 mL destilliertes Wasser		
- Kunststoffschale (24 cm x 24 cm)
- auf Kunststoffschale zugeschnittenes Whatman-Filterpapier

- 1 M 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)
Herstellung von 1 M DTT: DTT 1.543 g/10 mL destilliertes Wasser
- X-Galactosidase-Lösung (20 mg/mL)
(= 5-Brom-4-chloro-3-indolyl- β -galactosid)
Herstellung der X-Galactosidase-Lösung: 200 mg/10 mL Dimethylformamid
- X-Galactosidase-Arbeitslösung
Herstellung der X-Galactosidase-Arbeitslösung: 10 mL Z-Puffer
156 μ L X-Galactosidase-Lösung
100 μ L 1M DTT

Vorgehensweise:

- 2 Whatman-Filterpapiere in Plastikschaale legen
- Filterpapiere mit X-Galactosidase-Arbeitslösung tränken
- Filterpapiere glattrollen und Luftblasen entfernen
- Überstand an X-Galactosidase-Arbeitslösung abschütten
- Membran der SD2- und der SD4-Agarplatte für 2-3 Minuten in flüssigen Stickstoff legen
- Membranen luftblasenfrei auf die mit X-Galactosidase-Arbeitslösung getränkten Filterpapiere legen
- Filter beschriften
- Inkubation: 4 h
37°C-Brutschrank
- Interpretation:
Ist sowohl Wachstum auf SD4-Mangelmedium als auch ein positives X-Gal-Testergebnis (Blaufärbung) zu beobachten, so kann man daraus schließen, dass die beiden *bait*- und *prey*-Proteine miteinander interagieren.

4.28 Gelfiltration

Die Gelfiltration beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen einem Gelkompartiment und dem umgebenden Medium. Der Ausdruck Gelfiltration ist unglücklich gewählt, da im Gegensatz zur üblichen Filtration keine Komponenten zurückgehalten werden. Zutreffender ist die Bezeichnung Größenausschluss-Chromatographie.

Die Gelfiltration dient dazu, Proteine der Größe nach aufzutrennen. Dazu verwendet man ein poröses Säulenmaterial aus quervernetzten Polymeren (z.B. Dextran, Polyacrylamid), die eine Netz- oder Porenstruktur bilden. Die Poren besitzen unterschiedliche Größen, durch welche die Proteine hindurchfließen können.

Manche Anwendungen der Gelfiltration erfordern eine poröse Gelmatrix mit möglichst genau definierter Porengröße. Eine Säule, die mit solchen kugelförmigen Gelpartikeln gleicher Größe gepackt ist, besitzt zwei unterschiedliche messbare Flüssigkeitsvolumen. Das sog. Ausschlussvolumen, welches dem Volumen der Flüssigkeit außerhalb und zwischen den Gelpartikeln entspricht, und dem sog. Einschlussvolumen, welches im wesentlichen der Flüssigkeit innerhalb der Gelpartikel entspricht.

Für die Trennung entscheidend ist sowohl die Porengröße als auch der Durchmesser (Stokes-Radius) des Proteins.

Eine Mischung von Proteinen wird in einem möglichst kleinen Volumen auf die Oberfläche einer Gelfiltrationssäule aufgegeben. Große Moleküle, deren Größe den Porenquerschnitt übersteigen, können nicht in die Poren diffundieren und bewegen sich nur im äußeren Flüssigkeitsraum. Nach Durchlaufen des Ausschlussvolumens V_0 treten sie als erste durch die Säule. Kleine Proteine diffundieren in die porösen Gelpartikel und eluieren entsprechend später. Sehr kleine Moleküle und Salze eluieren nach dem Durchlauf von etwa einem Säulenvolumen. Im Trennbereich der Säule eluieren Moleküle der Größe nach mit einem individuellen charakteristischen Elutionsvolumen.

Die Trennung ist bei geringerer Flussrate besser.

benötigte Materialien und Reagenzien:

- Gelfiltrationssäule *HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-200 HR*
- Kalibrierungskit *Gel Filtration Calibration Kit: High Molecular Weight*
Kalibrierungskit *Gel Filtration Calibration Kit: Low Molecular Weight*
- Sterilfilter (0.45 µm, 0.22 µm)
- sterile Spritzen, (2 mL, 5 mL, 20 mL)
- Kanülen mit Luer Lock-Anschluß
- Equilibrierungspuffer (pH 7.0)

<u>Herstellung Equilibrierungspuffer:</u>	Saccharose	100	g
	CHAPS	2	g
	HEPES	9,52	g
	DTT	1,54	g

ad 2 L destilliertes Wasser
steril filtrieren

- Zentrifugenröhrchen für Ultrazentrifuge *Quick Seal Tubes* (13.5 mL)
- Chromatographie-System *ÄKTA Explorer 100* mit Fraktionssammler und 2 mL-Probenschleife
- *96-Deep-Well-Block* zur Fraktionssammlung
- Zellpellet aus 800 mL Baculo-infizierter Sf9-Suspensionskultur
- Flüssig-N₂
- Lysepuffer

<u>Herstellung Lysepuffer:</u>	Dulbecco's 1x PBS	10 mL
	Protease-Inhibitoren	1 Tablette
	β-Mercaptoethanol	10 µL

ad 10 mL destilliertes Wasser

- 10x SDS-Probenpuffer

<u>Herstellung Basispuffer für 10x SDS-Probenpuffer:</u>	1 M TrisHCl (pH 6.8)	44 mL
	SDS	12,8 g
	destilliertes Wasser	20 mL
	Bromphenolblau bis zur gewünschten Färbung	

<u>Herstellung fertiger 10x SDS-Probenpuffer:</u>	Basispuffer	20 mL
	Glycerin	10 mL
	β-Mercaptoethanol	10 mL
	destilliertes Wasser	10 mL

Vorgehensweise:

- Zellpellet in 2.5 mL Lysepuffer resuspendieren
- Zellyse: 5-maliger Einfrier-Auftau-Zyklus
5 min in Flüssig-N₂
5 min in 37°C-Wasserbad
- Zelllysate in Ultrazentrifugen-Röhrchen überführen
- Zentrifugation: 4 h
4°C
70 000 g
- Überstand abnehmen und luftblasenfrei in Probenschleife einspritzen
- Programm für Gelfiltrationslauf starten
- nach Beendigung des Gelfiltrationslaufes:
jeweils 800 µL Fraktion mit 250 µL 10x SDS-Probenpuffer mischen
- SDS-Proben bis zur Verwendung bei Western Blot-Analyse (siehe 4.16 und 4.19) bei -20°C einfrieren

4.29 Pull Downbenötigte Materialien und Reagenzien:

- Lysat des Interaktionspartners A als 6x His-Fusionsprotein
- gereinigtes Protein des Interaktionspartners B als GST-Fusionsprotein
- GSH-Agarosebeads
NiNTA-Sepharosebeads
- 1x Dulbeccos PBS ohne Magnesium und Calcium
- sterile 1.5 mL-Eppendorftubes
- 3x Laemmli-Probenpuffer

<u>Herstellung von 3x Laemmli-Probenpuffer:</u>			
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	10	mL	
20 % (w/v) SDS	45	mL	
86 % Glycerin	22,8	mL	
DTT	3,85	g	
Bromphenolblau (bis zur gewünschten Farbtintensität)			
<hr/>			
ad 100 mL destilliertes Wasser			

Vorgehensweise:

- *Ansatz A:* Mischen von 75 µL Lysat von Interaktionspartner A mit 100 µL NiNTA-Sepharose
- *Ansatz B:* Mischen von ca. 40 µg gereinigtes Protein von Interaktionspartner B mit 100 µL GSH-Agarose
- Inkubation: 2 – 3 h
4°C
Kipp-/Rollenmischer
- Zentrifugation: 2 min
RT
5 000 rpm

- Überstand abnehmen
- *Ansatz A:* Zugabe von ca. 40 µg gereinigtes Protein von Interaktionspartner B
Ansatz B: Zugabe von 75 µL Lysat von Interaktionspartner A
- Inkubation: über Nacht
4°C
Kipp-/Rollenmischer
- Zentrifugation: 2 min
RT
5 000 rpm
- 3-maliges Waschen der Beads:
Zugabe von 300 µL 1x PBS
Zentrifugation: 2 min
RT
5 000 rpm
- Zugabe von 75 µL 3x Laemmli-Probenpuffer
- Proben aufkochen: 95°C
10 min
- Zentrifugation: 5 min
RT
16 060 g
- Überstand auf SDS-Gel auftragen und Western Blot-Analyse machen (siehe 4.16 und 4.19)

5 Ergebnisse

5.1 Verifizierung der gefundenen Protein-Protein-Interaktion über einen weiteren Yeast-2-Hybrid-Assay

Parkin konjugiert als E3 Ubiquitin-Ligase Ubiquitin an Proteine und markiert diese so für ihren Abbau über das 26S Proteasom.

Um mehr über die Funktion von Parkin zu erfahren und um neue Interaktionspartner zu identifizieren, wurden Yeast-Two-Hybrid-Assays mit einer humanen fötalen cDNA-Hirn-Bibliothek (Clontech) durchgeführt (Arbeitsgruppe „Proteomics und molekulare Mechanismen neurodegenerativer Krankheiten“, Prof. Dr. E. E. Wanker, MDC für Molekulare Medizin Berlin).

Dabei wurden sowohl ein Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps als auch Volllängenkonstrukte von zwei als krankheitsauslösend bekannten Parkin-Mutanten (C289G und C418R) als *baits* verwendet.

Dies führte zur Isolierung eines 540 bp-großen cDNA-Klons. Sequenzanalysen offenbarten ein 88 Aminosäure-großes Hybrid-Protein, das als *PIP* (**P**arkin **I**nteracting **P**rotein) bezeichnet wurde. Es setzt sich aus 18 Codons der 3'-untranslatierten Region des v-Ha-ras-Genes und den letzten 70 Aminosäuren (Aminosäuren 179 – 248) der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4 (Synonyme: PSMA7, XAPC7, Untereinheit alpha Typ7) zusammen.

5.1.1 Die verschiedenen Parkin- und alpha4-Klone für den Yeast-Two-Hybrid-Assay

Um die Interaktion zwischen Parkin und der proteasomalen Untereinheit alpha4 zu verifizieren und um Hinweise auf Domänen zu erhalten, die bei der Interaktion eine Rolle spielen, wurde ein weiterer Yeast-Two-Hybrid-Assay mit verschiedenen Fragmenten beider Interaktionspartner durchgeführt.

Dazu wurden elf verschiedene Parkin-Klone, sowohl vom Wildtyp als auch von den beiden krankheitsauslösenden Mutanten stammend, und das carboxy-terminale Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4 (aus PIP kloniert; siehe S. 127) in die für das Yeast-Two-Hybrid-System konstruierten Vektoren pACT2 und pBTM116-D9 (Vektorkarten siehe 10.2) kloniert.

Die Klonierung der Konstrukte in den *bait*-Expressionsvektor pBTM116-D9 erfolgte über das GATEWAYTM-Klonierungssystem (siehe 4.10 und 5.2).

Die Klonierung der Konstrukte in den *prey*-Expressionsvektor pACT2 erfolgte als klassische Restriktionsklonierung über Sal I/Not I (siehe 5.3).

Eine Übersicht über die einzelnen Parkin-Konstrukte ist in Abbildung 21 dargestellt.

Vom Parkin-Wildtyp gab es neben einem Volllängenkonstrukt P-wt-FL auch ein Fragment P-wt-NT und ein Fragment P-wt-CT.

P-wt-NT umfasst den amino-terminalen Bereich von Parkin, von Aminosäure Methionin1 bis Arginin191. Dieser Bereich kodiert für die *Ubiquitin-like* (Ubl) –Domäne mit einem Teil der *Unique Parkin*-Domäne (UPD).

Das Konstrukt P-wt-CT umfasst den carboxy-terminalen Bereich, von Aminosäure Methionin192 bis Valin465, was der Ring-Box-Domäne mit einem Teil der *Unique Parkin*-Domäne entspricht.

Vier weitere Subklone des Parkin-Wildtyps stammen von Dr. Thomas Faupel.

Das Konstrukt TF_F2-R318 beinhaltet von Aminosäure L-Isoleucin2 bis Aminosäure L-Tyrosin318 die *Ubiquitin-like*-Domäne und die Ring 1-Domäne mit einem kleinen Teil der *In-Between-Ring*-Region.

Der Klon TF_F220-R318 umfasst den Bereich von Aminosäure L-Lysin220 bis L-Tyrosin318, und damit die letzten Aminosäuren der *Unique Parkin*-Domäne und die komplette Ring 1-Domäne.

Der Klon TF_F304-R404 repräsentiert von Aminosäure L-Asparagin304 bis Glycin404 die komplette *In-Between-Ring*-Region.

Klon TF_F395-F465 repräsentiert von Aminosäure L-Asparaginsäure395 bis Valin465 die komplette Ring 2-Domäne.

Neben den verschiedenen Wildtyp-Konstrukten von Parkin gibt es auch noch Konstrukte von zwei krankheitsauslösenden Mutanten. Bei beiden Mutanten handelt es sich jeweils um eine Punktmutation.

Bei der Mutante C289G wurde das Nukleotid 865 (T) durch ein G ersetzt, was einen Austausch der Aminosäure 289 von L-Cystein zu Glycin zur Folge hat.

Auch hier gibt es ein Volllängenkonstrukt P-289-FL und ein carboxy-terminales Fragment P-289-CT, das wie das C-terminale Fragment des Wildtyps den Bereich von Aminosäure Methionin192 bis Valin465 umfasst, und damit die Ring-Box mit einem Teil der *Unique Parkin*-Domäne repräsentiert.

Bei der Mutante C418R wurde das Nukleotid 1252 (T) gegen C ausgetauscht. Dies führte zum Austausch der Aminosäure 418 von L-Cystein zu L-Arginin. Hier gibt es ebenfalls ein Volllängenkonstrukt P-418-FL und ein C-terminales Fragment P-418-CT, das den Bereich von Aminosäure Methionin192 bis Valin465 umfasst, und damit die Ring-Box mit einem Teil der *Unique Parkin*-Domäne darstellt.

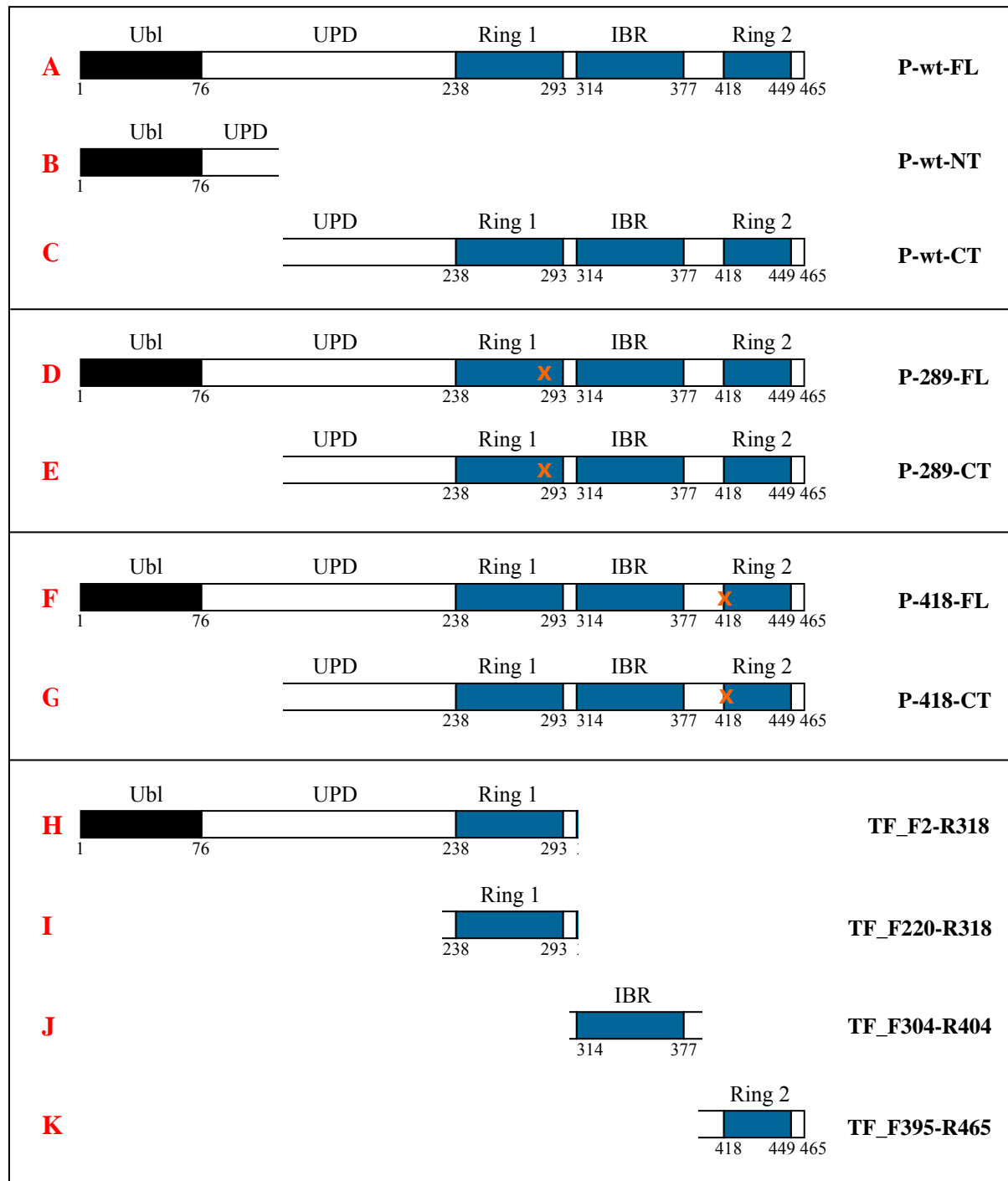


Abbildung 21: Die verschiedenen Parkin-Konstrukte.

A: **P-wt-FL** (Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps) **B:** **P-wt-NT** (N-terminales Fragment des Parkin-Wildtyps) **C:** **P-wt-CT** (C-terminales Fragment des Parkin-Wildtyps) **D:** **P-289-FL** (Volllängenkonstrukt der krankheitsauslösenden Parkin-Mutante C289G) **E:** **P-289-CT** (C-terminales Konstrukt der krankheitsauslösenden Parkin-Mutante C289G) **F:** **P-418-FL** (Volllängenkonstrukt der krankheitsauslösenden Parkin-Mutante C418R) **G:** **P-418-CT** (C-terminales Konstrukt der krankheitsauslösenden Parkin-Mutante C418R) **H:** **TF_F2-R318** (Parkin-Wildtyp-Konstrukt von L-Leucin2 bis L-Tyrosin318). **I:** **TF_F220-R318** (Parkin-Wildtyp-Konstrukt von L-Lysin220 bis L-Tyrosin318). **J:** **TF_F304-R404** (Parkin-Wildtyp-Konstrukt von L-Asparagin304 bis Glycin404). **K:** **TF_F395-R465** (Parkin-Wildtyp-Konstrukt von L-Asparaginsäure395 bis Valin465)

X: Position der jeweiligen Mutation

Der Interaktionspartner, die Untereinheit alpha4 des 26S Proteasoms, lag als Hybrid-Konstrukt PIP vor, das sich aus der Sequenz für die 18 Codons der 3'-untranslatierten Region des v-Ha-ras-Genes und der Sequenz für die letzten 70 Aminosäuren (Aminosäuren 179-248) der 26S-Proteasom-Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT) zusammensetzt.

Eine Übersicht über die PSMA7-Konstrukte ist in Abbildung 22 dargestellt.

Um das reine Fragment PSMA7-CT zu erhalten, ohne den v-Ha-ras-Anhang, wurde eine PCR mit dem entsprechenden Primerpaar durchgeführt (Primer siehe Tabelle 6) und PSMA7-CT so aus dem Hybrid-Klon PIP herauskloniert.

Das reine v-Ha-ras-Fragment wurde ebenfalls durch eine PCR mit dem entsprechenden Primerpaar (Primer siehe Tabelle 6) aus dem PIP-Hybrid herauskloniert.

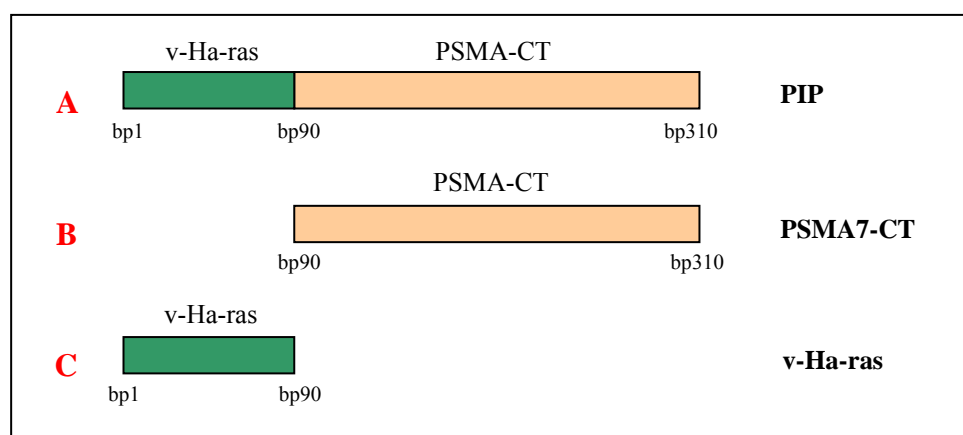


Abbildung 22: Die Konstrukte der 20S proteasomalen Untereinheit alpha4.

A: PIP (Hybrid aus 18 Codons der 3'-untranslatierten Region von v-Ha-ras und den letzten 70 C-terminalen Aminosäuren der proteasomalen Untereinheit alpha4). **B:** PSMA7-CT (C-terminales Fragment aus den letzten 70 Aminosäuren der proteasomalen Untereinheit alpha4). **C:** v-Ha-ras (18 Codons der 3'-untranslatierten Region von v-Ha-ras).

bp: Basenpaar

5.1.2 C-terminale Parkin-Konstrukte sind Autoaktivierer

Nach der Klonierung aller Konstrukte in die beiden Expressionsvektoren pACT2 und pBTM116-D9 (siehe 5.2 und 5.3), wurde der Yeast-Two-Hybrid-Assay durchgeführt. Dabei wurde der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm L40ccua verwendet.

Zuerst wurden alle Fragmente auf Autoaktivität hin getestet.

D.h. es wurde untersucht, ob bzw. welche Fragmente schon alleine, ohne dass eine Interaktion mit dem Bindungspartner stattfindet, die Transkription der Reportergene initiieren können. Denn nur die Klone, die keine solche Autoaktivität besitzen, können für den nachfolgenden Interaktions-Yeast-Two-Hybrid-Assay eingesetzt.

Als Reportergene fungierten die Gene für *HIS3*, *URA3* und *lacZ*.

HIS3 kodiert für das Enzym Imidazolacetolphosphat-Transaminase, die bei der Histidin-

Synthese die Verarbeitung von Imidazolacetol-Phosphat in Histidinol-Phosphat katalysiert und damit essentiell für die Herstellung von Histidin ist.

URA3 kodiert für das Enzym Orotidine-5'-phosphat-Decarboxylase, das in der Pyrimidin-Biosynthese involviert ist und dort die Decarboxylierung von Orotidine-5'-**monophosphate** (OMP) in Uridin-5'-**monophosphate** (UMP) katalysiert.

LacZ kodiert für das Enzym Beta-Galaktosidase, das zu der Subklasse der Glykosidase gehört und aus Beta-Galaktosiden (Di- und Oligosaccharide, synthetische Substrate mit einem Aglycon im Vollacetal) am nicht-reduzierenden Ende Galaktose abspaltet. Das Enzym fungiert unter anderem beim Yeast-Two Hybrid-System als Reportergen, da es ein recht breites Spektrum von farbigen oder fluoreszierende Komponenten aus entsprechenden Substraten produzieren kann. Zu den oft verwendeten chromogenen Substraten gehört X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid), dessen Abbau über die Beta-Galaktosidase zu blauen Präzipitaten führt.

Für den Autoaktivitätstest wurde ein *Mating* durchgeführt, bei dem die Fragmente einmal als *prey*-Klone (d.h. die Fragmente waren in den *prey*-Expressionsvektor pACT2 kloniert) mit dem leeren *bait*-Expressionsvektor pBTM116-D9 co-transformiert wurden, und einmal als *bait*-Klone (d.h. die Konstrukte wurden in den *bait*-Expressionsvektor pBTM116-D9 kloniert) mit dem leeren *prey*-Expressionsvektor pACT2.

Auch die beiden Expressionsvektoren wurden auf Autoaktivität hin getestet.

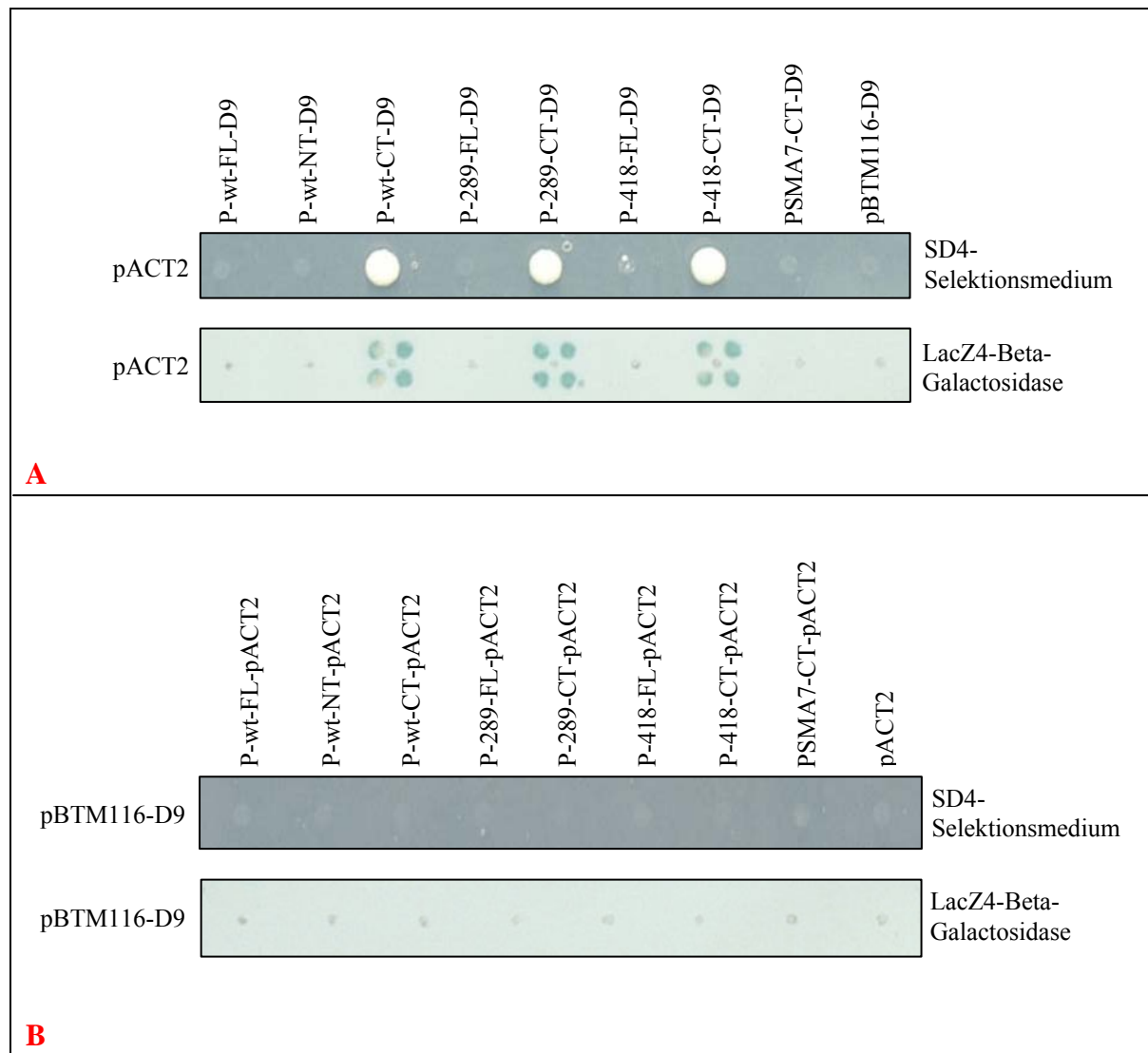


Abbildung 23: Test der Konstrukte auf Autoaktivierung der Reportergene. (1)

Zur Überprüfung, ob die einzelnen Konstrukte die Transkription der Reportergene selbst initiieren, wurden die verschiedenen Konstrukte einmal als *prey*-Klone mit dem leeren *bait*-Expressionsvektor pBTM116-D9 co-transformiert und einmal als *bait*-Klone mit dem leeren *prey*-Expressionsvektor pACT2.

A: Die einzelnen Fragmente als *bait*-Klone (in Expressionsvektor pBTM116-D9) gegen den leeren *prey*-Expressionsvektor pACT2. **B:** Die einzelnen Fragmente als *prey*-Klone (in Expressionsvektor pACT2) gegen den leeren *bait*-Expressionsvektor pBTM116-D9.

Auf die Membranen wurde nach 2x2-Mustern gespottet.

SD4-Selektionsmedium: Medium ohne die Aminosäuren Tryptophan, Leucin, Histidin und Uracil.

LacZ4-Beta-Galactosidase: Membran, die auf SD4-Selektionsmedium inkubiert wurde und mit der anschließend der Beta-Galactosidase-Test durchgeführt wurde.

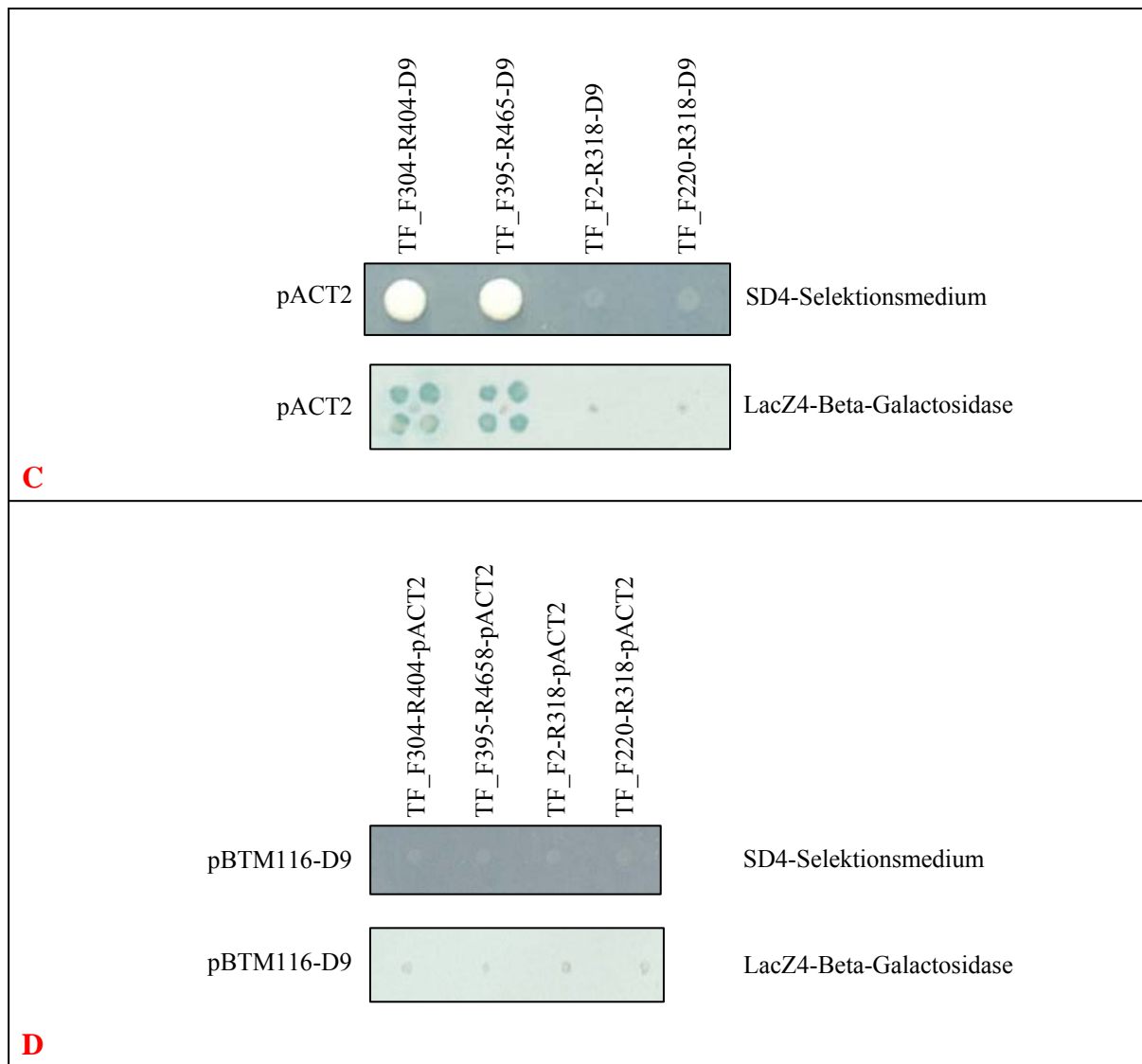


Abbildung 24: Test der Konstrukte auf Autoaktivierung der Reportergene. (2)

Zur Überprüfung, ob die einzelnen Konstrukte die Transkription der Reportergene selbst initiieren, wurden die verschiedenen Konstrukte einmal als *prey*-Klone mit dem leeren *bait*-Expressionsvektor pBTM116-D9 co-transformiert und einmal als *bait*-Klone mit dem leeren *prey*-Expressionsvektor pACT2.

C: Die einzelnen Fragmente als *bait*-Klone (in Expressionsvektor pBTM116-D9) gegen den leeren *prey*-Expressionsvektor pACT2. **D:** Die einzelnen Fragmente als *prey*-Klone (in Expressionsvektor pACT2) gegen den leeren *bait*-Expressionsvektor pBTM116-D9.

Auf die Membranen wurde nach 2x2-Mustern gespottet.

SD4-Selektionsmedium: Medium ohne die Aminosäuren Tryptophan, Leucin, Histidin und Uracil.

LacZ4-Beta-Galactosidase: Membran, die auf SD4-Selektionsmedium inkubiert wurde und mit der anschließend der Beta-Galactosidase-Test durchgeführt wurde.

Konstrukt	Autoaktivität als <i>bait</i>	Autoaktivität als <i>prey</i>	Verwendung bei <i>Interaktions Mapping</i>
P-wt-FL	nein	nein	✓
P-wt-NT	nein	nein	✓
P-wt-CT	JA	nein	-
P-289-FL	nein	nein	✓
P-289-CT	JA	nein	-
P-418-FL	nein	nein	✓
P-418-CT	JA	nein	-
TF_F2-R318	nein	nein	✓
TF_F220-R318	nein	nein	✓
TF_F304-R404	JA	nein	-
TF_F395-R465	JA	nein	-
PSMA7-CT	nein	nein	✓
pBTM116-D9	nein	nein	
pACT2	nein	nein	

Tabelle 5: Zusammenfassung des Reporteraktivitätsassays.

✓ : Konstrukte, die in der nachfolgenden *Interaktions Mapping*-Analyse eingesetzt werden konnten

- : Konstrukte, die Autoaktivität zeigten

pBTM116-D9: GATEWAY™ Expressionsvektor für *bait*s

pACT2: Expressionsvektor für *preys*

Die Ergebnisse der Reporteraktivitätsassays zeigen, dass alle drei C-terminalen Parkin-Konstrukte P-wt-CT, P-289-CT und P-418-CT als *bait*-Klone in dem Expressionsvektor pBTM116-D9 die Reportergene *HIS3*, *URA3* (Nachweis anhand von Wachstum auf SD4-Minimalmediumplatten) und *lacZ* (Nachweis über Blaufärbung der Kolonien auf den Membranen nach dem Beta-Galaktosidase-Test) nach Co-Transformation mit dem leeren pACT2-Vektor in den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40ccua aktivieren (siehe Abbildung 23).

Im Gegensatz zu den Volllängenkonstrukten, sowohl des Parkin-Wildtyps P-wt-FL als auch der beiden Parkin-Mutanten P-289-FL und P-418-FL, und des amino-terminalen Fragmentes des Wildtyps P-wt-NT, die die Transkription der Reportergene nicht selbst initiieren können (siehe Abbildung 23). Die carboxy-terminalen Parkin-Fragmente konnten dem zu Folge nicht für die Kartierung der Bindungsregion über das Yeast-Two-Hybrid-System verwendet werden.

Alle *prey*-Klone in Expressionsvektor pACT2 waren nicht-autoaktivierend (siehe Abbildung 23) und wurden in der nachfolgenden *Interaktions Mapping*-Analyse eingesetzt.

Von den vier Parkin-Wildtyp-Konstrukten von Dr. Thomas Faupel waren ebenfalls zwei Konstrukte als *bait*s nach Co-Transformation mit dem leeren *prey*-Vektor pACT2 Autoaktivierer: TF_F304-R404 und TF_F395-R465 (siehe Abbildung 24). Diese beiden Parkin-Konstrukte umfassen ebenfalls jeweils einen Teil des carboxy-terminalen Bereiches von Parkin: die Ring-Box-Domäne. Dabei entspricht das Konstrukt TF_F304-R404 der In-

Between-Ring-Region, und TF_F395-R465 repräsentiert den Ring 2-Bereich.

Die beiden anderen Konstrukte, TF_F2-R318 und TF_F220-R318, zeigten keine Autoaktivität (siehe Abbildung 24).

Die beiden Autoaktivierer TF_F304-R404 und TF_F395-R465 konnten, wie die anderen C-terminalen Parkin-Konstrukte P-wt-CT, P289-CT und P-418-CT, nicht für das *Interaktions Mapping* eingesetzt werden. Als *prey*-Klone waren alle vier Thomas-Faupel-Konstrukte nicht-autoaktivierend und damit beim *Interaktions Mapping* einsetzbar.

Der Interaktionspartner PSMA7-CT gehörte ebenfalls zu den Konstrukten, die die Transkription der Reportergene nicht selbst initiieren konnten, weder als *bait*-Klon in dem Expressionsvektor pBTM116-D9 als noch als *prey*-Klon in dem Expressionsvektor pACT2 (siehe Abbildung 23).

Da auch die beiden Vektoren keine Autoaktivität erkennen ließen, konnte die Kartierung der interagierenden Domäne des carboxy-terminalen Fragmentes der proteasomalen Untereinheit alpha4 zumindest mit den nicht-autoaktivierenden Parkin-Konstrukten durchgeführt werden.

5.1.3 Parkin interagiert mit dem carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4

Mit den Konstrukten, die keine Autoaktivierung der Reportergene zeigten, wurde nun der eigentliche Yeast-Two-Hybrid-Assay zur *Interaktions Mapping*-Analyse durchgeführt.

Das Ergebnis, die positiv auf Interaktion getesteten Konstruktpaarungen, sind in Abbildung 25 dargestellt.

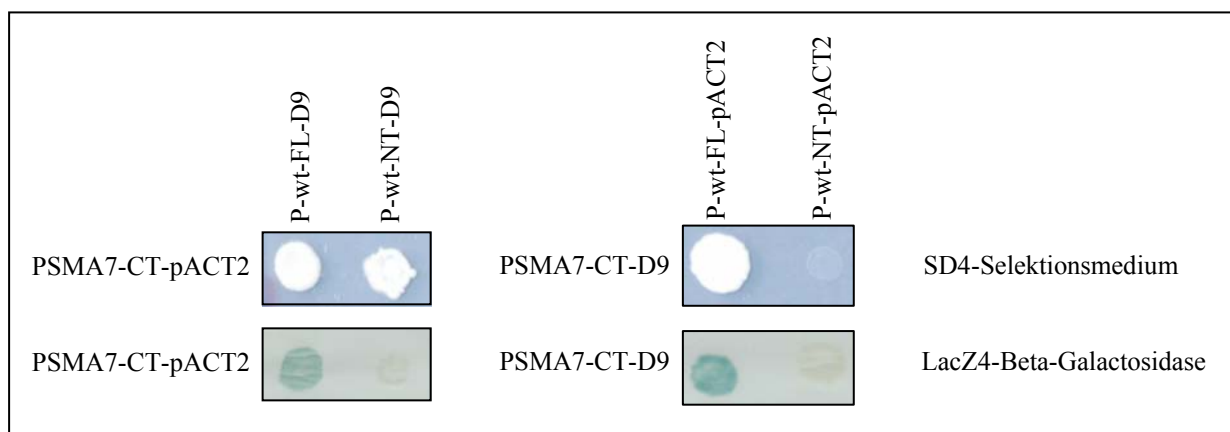


Abbildung 25: Ergebnis der Interaktions Mapping-Analyse.

SD4-Selektionsmedium: Medium ohne die Aminosäuren Tryptophan, Leucin, Histidin und Uracil.

LacZ4-Beta-Galactosidase: Membran, die auf SD4-Selektionsmedium inkubiert wurde und mit der anschließend der Beta-Galactosidase-Test durchgeführt wurde.

Die Yeast-Two-Hybrid-Studien zeigen, dass das Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps P-wt-FL mit dem carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT) interagiert, im Gegensatz zu dem amino-terminalen Fragment des Parkin-

Wildtyps P-wt-NT. Dies deutet an, dass die Bindungsregion im C-terminalen Bereich von Parkin lokalisiert sein muss. Untermuert wird diese Vermutung noch dadurch, dass bei den Volllängenkonstrukten der beiden Mutanten C289G und C418R (P-289-FL und P-418-FL) keine Interaktion zu beobachten war. Bei beiden Konstrukten liegt die Mutation im C-terminalen Bereich: bei der Mutante C289G in Ring 1 und bei der Mutante C418R in Ring 2. Dies deutet des weiteren an, dass es nicht nur eine einzige Bindungsdomäne gibt, sondern mehrere (mindestens zwei), die für die Interaktion von Parkin mit der alpha4-Untereinheit verantwortlich sind.

Bei allen anderen Parkin-Konstrukten (P-289-FL, P-418-FL und allen vier Thomas-Faupel-Konstrukten), war keinerlei Wachstum auf dem SD4-Selektionsmedium zu erkennen.

Da aufgrund der Autoaktivität der carboxy-terminalen Fragmente eine Verbindung von alpha4 mit dem C-Terminus von Parkin in dem Yeast-Two-Hybrid-Assay nicht untersucht werden konnte, wurden Bindungsassays mit beiden Interaktionspartnern mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden durchgeführt.

5.2 Klonierung der Parkin-Konstrukte und des Fragmentes der 26S proteasomalen Untereinheit alpha4 über die GATEWAY™ Cloning Technology

Da die Interaktion von Parkin mit der Untereinheit alpha4 (PSMA7) des 26S Proteasoms in verschiedenen molekularbiologischen Systemen untersucht werden sollte, mussten die einzelnen Parkin-Konstrukte und das PSMA7-CT-Fragment in die verschiedenen, dem jeweiligen System angepassten Vektoren kloniert werden:

Für die Expression der Proteine in Insektenzellenzellen *Spodoptera frugiperda* Sf9 via dem **Baculovirus Expression Vector System (BEVS)** wurde in die beiden Vektoren pAcHLT-D46 und pAcG2T-D47 kloniert. Beide Vektoren besitzen unterschiedliche Tags, die N-terminal lokalisiert sind. pAcHLT-D46 besitzt einen 6x His-Tag (= Tag aus 6 hintereinanderliegenden Histidin-Resten) und pAcG2T-D47 einen **Glutathion-S-Transferase (GST)** –Tag.

Für die Co-Lokalisationen und Immunpräzipitationen wurden HeLa-Zellen verwendet. Die dafür vorgesehenen Expressionsvektoren waren pdECFP-D11 und pdEYFP-D12. Beide Vektoren besitzen Fluoreszenzprotein-Tags. Der Vektor pdECFP-D11 besitzt einen **Cyan Fluorescence Protein (CFP)** –Tag, der N-terminal lokalisiert ist. pdEYFP-D12 besitzt einen C-terminalen **Yellow Fluorescence Protein (YFP)** –Tag.

Zusätzlich musste das PSMA7-CT-Fragment noch in die beiden Vektoren pCMV-Myc und pCMV-HA kloniert werden, die Nicht-GATEWAY™-kompatibel waren. Der Vektor pCMV-Myc besitzt einen N-terminalen c-Myc-Tag, der pCMV-HA-Vektor einen N-terminalen **HämAgglutinin (HA)** –Tag. Die Klonierung in diese beiden Nicht-GATEWAY™-kompatiblen Vektoren erfolgte über eine Eco RI/Xho I-Schnittstellenklonierung (siehe 5.3).

Diese Klonierung der Fragmente in die verschiedenen Expressionsvektoren der unterschiedlichen molekularbiologischen Systeme erfolgte im allgemeinen über das GATEWAY™-System (siehe 4.10).

5.2.1 Herstellung der Expressionsvektoren

Bevor mit der eigentlichen Klonierung der Konstrukte über das GATEWAY™-System in die unterschiedlichen Expressionsvektoren begonnen wurde, wurden die Expressionsvektoren GATEWAY™-kompatibel gemacht, die noch nicht als entsprechende GATEWAY™-Expressionsvektoren vorlagen.

Dazu gehörten die beiden Vektoren für das *Baculovirus Expresssion Vector System*: pAcHLT-C und pAcG2T (Pharmingen, BD Biosciences).

Die Vektoren pBTM116-D9, pdECFP-D11 und pdEYFP-D12 lagen schon GATEWAY™-kompatibel kloniert vor (Vektorkarten siehe 10.2).

Die Vektoren wurden GATEWAY™-kompatibel gemacht, indem die sog. Todeskassette mit den sie beiderseits flankierenden *attP*-Rekombinationsstellen über Schnittstellenklonierung in die verschiedenen Expressionsvektoren eingebracht wurde.

Über die eingebrachten Rekombinationsstellen erfolgte dann bei der LR-Reaktion der Einbau der gewünschten DNA-Sequenz, die von *attL*-Rekombinationsstellen flankiert ist.

(GATEWAY™-Klonierungssystem siehe 4.10)

Die einzubauende Todeskassette befand sich in dem Vektor pCMV (Vektorkarte siehe 10.2). Vektor-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Eco RV, das beiderseits der Todeskassette schneidet, verdaut und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Bande, die die Todeskassette enthält (ca. 1,7 kb), wurde ausgeschnitten und die DNA aus diesem Gelstück eluiert (siehe Abbildung 26).

Bei der Auswahl der Todeskassette musste der Leserahmen berücksichtigt werden, damit es bei der Klonierung in den vorgesehenen Vektor nicht zu einer Verschiebung des Leserasters kommt. Für die beiden Vektoren pAHLT-C und pAcG2T wurde jeweils die Todeskassette mit dem Leserahmen B (*rfB*) benötigt.

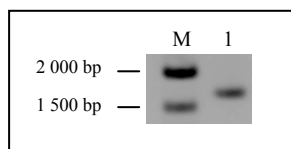


Abbildung 26: Todeskassette *rfB* nach Gel-Extraktion.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 1h bei 150V, 400mA, 150W.

Eco RV-Verdau des pCMV-Vektors mit Todeskassette *rfB* in Agarosegel aufgetrennt. Bande der Todeskassette *rfB* ausgeschnitten und die DNA aus dem Gelstück eluiert. 3 µL des Eluates aufgetragen.

M: Marker; Spur 1: Todeskassette *rfB*.

Die beiden Baculo-Vektoren wurden jeweils mit einem Restriktionsenzym, das den Vektor nur ein Mal schneidet, linearisiert, damit die Todeskassette reinligiert werden konnte. Der Vektor pAHLT-C wurde mit dem Restriktionsenzym Stu I geschnitten, der Vektor pAcG2T mit Sma I. Danach erfolgte die Ligation der aus einem Gel eluierten Todeskassette *rfB* in jeden der beiden linearisierten Vektoren.

Zur Kontrolle, ob die Todeskassette in die Vektoren eingebaut wurde und ob die Todeskassette auch die richtige Orientierung besitzt, erfolgte ein Kontrollverdau der DNA mehrerer Klone (siehe Abbildung 27).

Dazu wurde die DNA der Klone für pAHLT-C mit dem Restriktionsenzym Eco RI geschnitten, DNA der Klone für pAcG2T mit Eag I.

Darüber hinaus wurden die Klone kontroll-sequenziert.

pAHLT-C wurde dabei mit dem Sequenzierprimer AHLT-F sequenziert, pAcG2T mit 3pGEX (Primer siehe 3.11).

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Sanger-Prinzip.

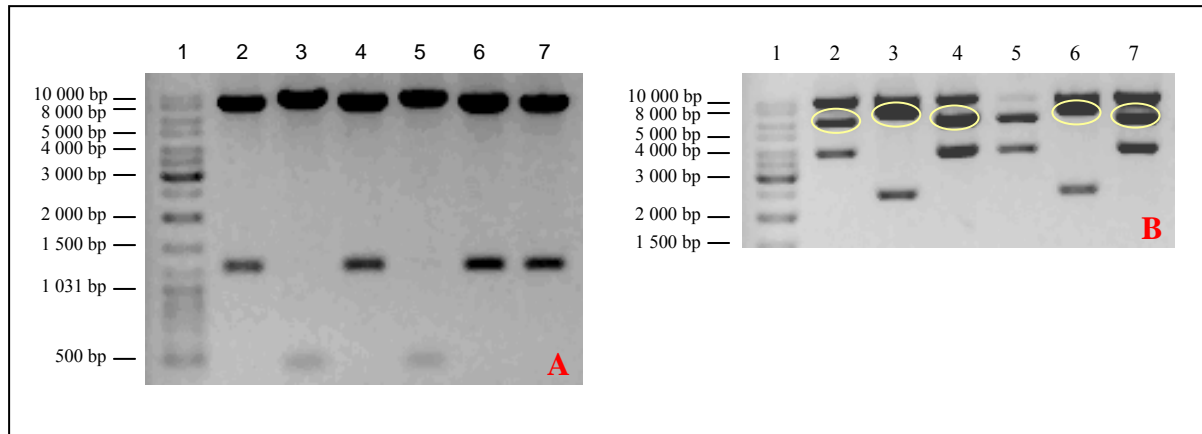



Abbildung 27: Kontrollverdaus der erhaltenen GATEWAY™-kompatiblen Baculo-Expressionsvektoren pAcHLT-D46 und pAcG2T-D47.

1 %ige Agarosegele (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 1h bei 150V, 400mA, 150W. Je ca. 300 ng DNA verdaut und aufgetragen. Agarosegel A: Verdau mit Restriktionsenzym Eco RI; Agarosegel B: Verdau mit Restriktionsenzym Eag I.

Beladungsplan Gel A: Spur 1: Marker; Spur 2: pAcHLT-D46 (Klon 1); Spur 3: pAcHLT-D46 (Klon 2); Spur 4: pAcHLT-D46 (Klon 3); Spur 5: pAcHLT-D46 (Klon 4); Spur 6: pAcHLT-D46 (Klon 5); Spur 7: pAcHLT-D46 (Klon 6).

Beladungsplan Gel B: Spur 1: Marker; Spur 2: pAcG2T-D47 (Klon 1); Spur 3: pAcG2T-D47 (Klon 2); Spur 4: pAcG2T-D47 (Klon 3); Spur 5: pAcG2T-D47 (Klon 4); Spur 6: pAcG2T-D47 (Klon 5); Spur 7: pAcG2T-D47 (Klon 6).

 unverdaute DNA

Anmerkung:

Da die Vektoren jetzt als GATEWAY™-Expressionsvektoren vorlagen, erhielten sie eine RZPD-interne ID-Nummer, die einen Vektor als GATEWAY™-Expressionsvektor ausweist:

pAcHLT-C erhielt die Nummer D46 (pAcHLT-D46), pAcG2T die Nummer D47 (pAcG2T-D47).

Vektorkarten: siehe 10.2

Bei Einbau und richtiger Orientierung der Todeskassette *r/B* wurde bei Vektor pAcHLT-C zwei Banden, bei 9 360 bp und 460 bp, erwartet und bei pAcG2T zwei Banden von 3 880 bp und 6 360 bp.

In Abbildung 27 A sind die Kontrollverdaus der DNA von sechs verschiedenen Klone aufgetragen, die für pAcHLT-D46 gepickt wurden.

In den Spuren 2 und 4 handelt es sich um Klone, bei denen die Todeskassette nicht nur eingebaut wurde, sondern auch in der richtigen Orientierung. Dies zeigen die beiden Banden bei 9 360 bp und 460 bp.

Die Spuren 1, 3, 5 und 6 zeigen „falsch-positive“ Klone: die Todeskassette wurde zwar eingebaut, allerdings in der falschen Orientierung. Bei falscher Orientierung kommt es zu zwei Fragmenten mit den Größen 8 500 bp und 1 300 bp.

In Abbildung 27 B sind die Kontrollverdaus der DNA für sechs verschiedene gepickte Klone für den Vektor pAcG2T-D47 aufgetragen.

Die Spuren 2, 4, 5 und 7 zeigen, dass es sich hier um Klone mit richtig orientiert eingebauter Todeskassette handelte: eine Bande bei 3 880 bp und eine Bande bei 6 360 bp.

Bei den beiden Spuren 3 und 6 handelte es sich um „falsch-positive“ Klone, bei denen die Todeskassette in der falschen Orientierung eingebaut wurde. Daher auch die zwei Banden bei 8 000 bp und 2 200 bp, und nicht bei 3 880 bp und 6 360 bp, wie man es bei den Klonen mit richtig eingebauter Todeskassette erhielt.

5.2.2 Klonierung der Konstrukte in die GATEWAY™-Expressionsvektoren

Um alle zu klonierenden Konstrukte entsprechend GATEWAY™-kompatibel zu machen und in den GATEWAY™-Eingangsvektor pDONR201 (Vektorkarte siehe 10.2) klonieren zu können, wurde für jedes Fragment zunächst ein genspezifisches Primerpaar konstruiert. Sowohl der *Forward*- als auch der *Reverse*-Primer hatten einen Überhang von 12 Basen für die *attB*-Rekombinationsstellen. An diesen Überhang konnten dann in der nachfolgenden zweiten PCR (*attB*-Tail-PCR) die Primer für die kompletten *attB*-Rekombinationsstellen binden. Die Produkte aus dieser zweiten PCR wurden direkt in die BP-Reaktion eingesetzt. Über die BP-Reaktion wurde das PCR-Produkt, das nach der 2-Schritt-PCR beiderseits die benötigten Rekombinationsstellen besitzt, durch homologe Rekombination in den GATEWAY™-Eingangsvektor pDONR201 eingebracht. (GATEWAY™-Klonierungssystem siehe 4.10)

Zur Überprüfung, ob die bei der BP-Reaktion erhaltenen Klone auch die jeweils richtige DNA-Sequenz besitzen, wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym Bsr G1 gemacht. Bsr G1 schneidet beiderseits der Rekombinationsstellen (siehe Abbildung 30). Hatte die BP-Reaktion korrekt funktioniert, ergab sich ein typisches Bandenmuster: eine Vektorbande auf einer Höhe von etwa 2.3 kb, und eine oder mehrere Banden für das Insert, die einzeln bzw. zusammen die Größe des Inserts haben mussten.

Um sicherzustellen, dass es bei der Rekombination zu keinem *Frameshift* (Verschiebung des Leserahmens) gekommen war, wurden die Eingangsklone sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Sanger-Prinzip unter Verwendung des Primers KanDon PrimR5 (Primer siehe 3.11).

Sofern die Sequenzierung ergab, dass der jeweilige Klon in Ordnung war, wurde von diesen Eingangsklonen ausgehend die Konstrukte über die LR-Reaktion in die verschiedenen GATEWAY™-Expressionsvektoren kloniert.

5.2.2.1 Genspezifische PCR

Primer-Paar für die genspezifische PCR (Forward-Primer / Reverse-Primer)	Amplifikat	Produkt-Größe [bp]
Park2_F1 / Park2_R1	P-wt-FL	1 420
Park2_F1 / Park2_R2	P-wt-NT	600
Park2_F2 / Park2_R1	P-wt-CT	850
Park2_F1 / Park2_R1	P-289-FL	1 420
Park2_F2 / Park2_R1	P-289-CT	850
Park2_F1 / Park2_R1	P-418-FL	1 420
Park2_F2 / Park2_R1	P-418-CT	850
v-Ha-ras_G_F1 / PSMA7_G_R1	PIP1	310
PSMA7_G_F1 / PSMA7_G_R1	PSMA7-CT	220
v-Ha-ras_G_F1 / v-Ha-ras_G_R1	v-Ha-ras	90
TF_F2 / TF_R318	TF_F2-R318	950
TF_F220 / TF_R318	TF_F220-R318	300
TF_F304 / TF_R404	TF_F304-R404	330
TF_F395 / TF_R465	TF_F395-R465	250

Tabelle 6: Bei der genspezifischen PCR verwendete Primerpaare für das jeweilige Konstrukt und Größen der Amplifikate.

F: *Forward*-Primer

R: *Reverse*-Primer

PCR-Programm „55-30“			
Schritt		Temperatur	Dauer
1	Anfangs-Denaturierung	95°C	1 min
2	Denaturierung	95°C	30 sec
3	Primer-Anlagerung	55°C	30 sec
4	Primer-Verlängerung	72°C	2 min
5	Zyklenzahl	goto 2	29 x
6	Abschluß-Verlängerung	72°C	7 min
7		4°C	forever

Tabelle 7: Bei der genspezifischen PCR verwendetes PCR-Programm.

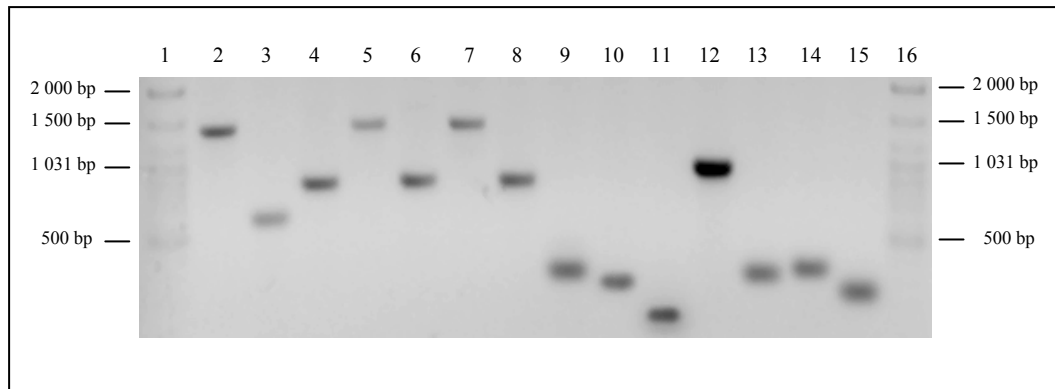


Abbildung 28: Amplifikate der genspezifischen PCR.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 1h bei 150V, 400mA, 150W. Je 5 μ L PCR-Produkt aufgetragen. Spur 1: Marker; Spur 2: P-wt-FL; Spur 3: P-wt-NT; Spur 4: P-wt-CT; Spur 5: P-289-FL; Spur 6: P-289-CT; Spur 7: P-418-FL; Spur 8: P-418-CT; Spur 9: PIP1; Spur 10: PSMA7-CT; Spur 11: v-Ha-ras; Spur 12: TF_F2-R318; Spur 13: TF_F220-R318; Spur 14: TF_F304-R404; Spur 15: TF_F395-R465; Spur 16: Marker.

Die Größe des jeweiligen PCR-Produktes entspricht dabei der Größe des jeweils erwarteten Produktes (erwartete Größen der Amplifikate siehe Tabelle 6).

Die Produkte der genspezifischen PCR wurden direkt als Matrize bei der nachfolgenden *attB*-Tail-PCR eingesetzt (siehe 5.2.2.2).

5.2.2.2 attB-Tail-PCR

Primer-Paar für die attB-Tail-PCR (Forward-Primer / Reverse-Primer)	Amplifikat	Produkt-Größe [bp]
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	P-wt-FL	1 420
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	P-wt-NT	600
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	P-wt-CT	850
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	P-289-FL	1 420
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	P-289-CT	850
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	P-418-FL	1 420
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	P-418-CT	850
attB1-Tail_F / attB2-Tail_R	PIP1	310
attB1-Tail_F / attB2-Tail_R	PSMA7-CT	220
attB1-Tail_F / attB2-Tail_R	v-Ha-ras	90
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	TF_F2-R318	950
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	TF_F220-R318	300
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	TF_F304-R404	330
For-Tail_Parkin / Rev-Tail_Parkin	TF_F395-R465	250

Tabelle 8: Bei der attB-Tail-PCR verwendete Primerpaare für das jeweilige Konstrukt und Größen der Amplifikate.

F bzw. For: *Forward*-Primer

R bzw. Rev: *Reverse*-Primer

PCR-Programm „Tail40“			
Schritt		Temperatur	Dauer
1	Anfangs-Denaturierung	95°C	1 min
2	Denaturierung	95°C	30 sec
3	Primer-Anlagerung	40°C	20 sec
4	Primer-Verlängerung	72°C	2 min
5	Zyklenzahl	goto 2	5 x
6	Denaturierung	95°C	30 sec
7	Primer-Verlängerung	72°C	2 min
8	Zyklenzahl	goto 6	12 x
9	Abschluß-Verlängerung	72°C	10 min
10		4°C	forever

Tabelle 9: Bei der attB-Tail-PCR verwendetes PCR-Programm.

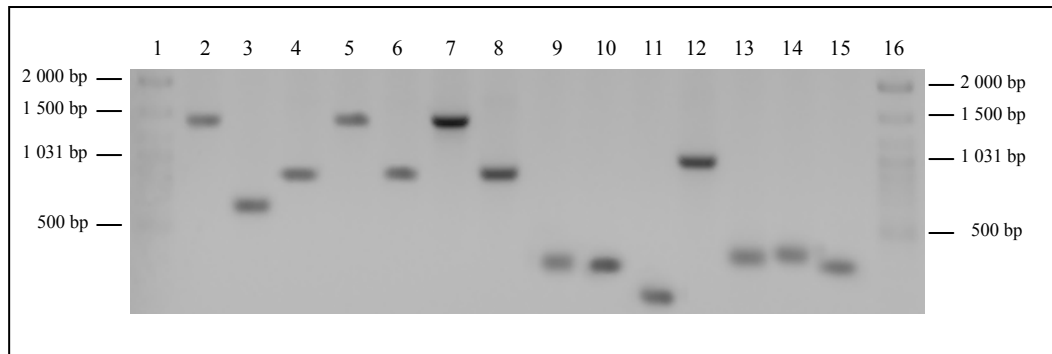


Abbildung 29: PCR-Produkte der *attB*-Tail-PCR.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 1h20 bei 150V, 400mA, 150W. Je 5 µL PCR-Produkt aufgetragen. Spur 1: Marker; Spur 2: P-wt-FL; Spur 3: P-wt-NT; Spur 4: P-wt-CT; Spur 5: P-289-FL; Spur 6: P-289-CT; Spur 7: P-418-FL; Spur 8: P-418-CT; Spur 9: PIP1; Spur 10: PSMA7-CT; Spur 11: v-Ha-ras; Spur 12: TF_F2-R318; Spur 13: TF_F220-R318; Spur 14: TF_F304-R404; Spur 15: TF_F395-R465; Spur 16: Marker.

Die Größe der jeweiligen PCR-Produkte entspricht dabei den Größen der erwarteten Produkte (erwartete Größen der Amplifikate siehe Tabelle 8).

Die Produkte dieser *attB*-Tail-PCR wurden direkt in die BP-Reaktion eingesetzt (siehe 5.2.2.3).

5.2.2.3 Überprüfung der Eingangsklone in dem Vektor pDONR201

Über die BP-Reaktion wurden die gewünschten Konstrukte durch homologe Rekombination in den leeren Eingangsvektor pDONR201 kloniert.

pDONR201 ist ein an das GATEWAYTM-System adaptierter Vektor, der konstruiert wurde, um nach der Rekombination mit einem *attB*-Klon oder einem *attB*-PCR-Produkt Eingangsklone zu generieren, die die gewünschte DNA-Sequenz enthalten, die wieder von Rekombinationsstellen, den *attL*-Rekombinationsstellen, flankiert wird. Über diese *attL*-Rekombinationsstellen erfolgte dann in der nachfolgenden LR-Reaktion der Transfer der jeweils gewünschten DNA-Sequenz von dem Eingangsklon in den jeweiligen GATEWAYTM-Expressionsvektor.

(GATEWAYTM-Klonierungssystem siehe 4.10)

Zur Überprüfung der bei der BP-Reaktion erhaltenen Klone wurde ein Bsr G1-Verdau durchgeführt.

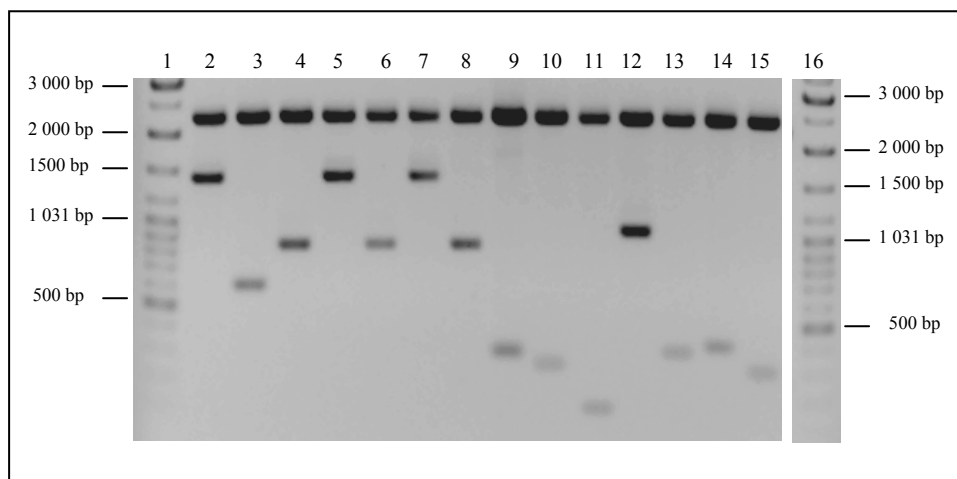


Abbildung 30: Bsr G1-Kontrollverdau der Eingangsklone in Vektor pDONR201.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 1h20 bei 150V, 400mA, 150W. Je ca. 300 ng gereinigte DNA aus Minipräparationen verdaut. Verwendetes Restriktionsenzym: BsrG1. Spur 1: Marker; Spur 2: P-wt-FL; Spur 3: P-wt-NT; Spur 4: P-wt-CT; Spur 5: P-289-FL; Spur 6: P-289-CT; Spur 7: P-418-FL; Spur 8: P-418-CT; Spur 9: PIP1; Spur 10: PSMA7-CT; Spur 11: v-Ha-ras; Spur 12: TF_F2-R318; Spur 13: TF_F220-R318; Spur 14: TF_F304-R404; Spur 15: TF_F395-R465; Spur 16: Marker.

Anhand des Agarosegeles des Bsr G1-Verdaus ließen sich Rückschlüsse darauf ziehen, ob die Inserts der aus der BP-Reaktion hervorgegangenen Klone die richtige Größe hatten.

In jeder Spur erkennt man jeweils die Vektorbande bei ca. 2.3 kb und eine Bande für das jeweilige Insert. Jeweils nur eine Bande für das Insert bedeutet, dass das Inserts keine weitere Schnittstelle(n) für Bsr G1 besitzt.

Die Größen der jeweiligen Produkte entsprechen dabei den Größen der erwarteten Produkte (siehe Tabelle 10).

Eingangsklone in pDONR201			
Verdau mit BsrG1			
Konstrukt	Insert-Größe incl. <i>attL</i> -Rekombinationsstellen [bp]	Vektor + Insert [bp]	erwartete Banden bei [bp]
P-wt-FL	1 620	3 860	2 410 +1 450
P-wt-NT	800	3 040	2 410 + 630
P-wt-CT	1 050	3 290	2 410 + 880
P-289-FL	1 620	3 860	2 410 +1 450
P-289-CT	1 050	3 290	2 410 + 880
P-418-FL	1 620	3 860	2 410 +1 450
P-418-CT	1 050	3 290	2 410 + 880
PIP	510	2 750	2 410 + 340
PSMA7-CT	420	2 660	2 410 + 250
v-Ha-ras	290	2 530	2 410 + 120
TF_F2-R318	1 150	3 390	2 410 + 980
TF_F220-R310	500	2 740	2 410 + 330
TF_F304-R404	530	2 770	2 410 + 360
TF_F395-R465	450	2 690	2 410 + 280

Tabelle 10: Erwartete Größen beim Kontrollverdau der Eingangsklone in Vektor pDONR201 mit dem Restriktionsenzym Bsr G1.

attL-Rekombinationsstellen: 200 bp (*attL*1= 100 bp + *attL*2 = 100 bp)

Die Größen in der Spalte „erwartete Banden bei [bp]“ wurden so berechnet, als würde das Insert keine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bsr G1 besitzen.

Die Sequenzanalyse mit dem Primer KanDon PrimR5 (Primer siehe 3.11), die zur Überprüfung der pDONR201-Eingangsklone bezüglich *Framehifts* (Verschiebung des Leserahmens) durchgeführt wurde, ergab, dass alle Eingangsklone in Ordnung waren.

5.2.2.4 Überprüfung der Expressionsklonen in den verschiedenen Vektoren

Von den Eingangsklonen ausgehend wurde über die LR-Reaktion die verschiedenen Konstrukte in die unterschiedlichen GATEWAY™-Expressionsvektoren kloniert.

Auch bei der LR-Reaktion wird die gewünschte DNA-Sequenz über homologe Rekombination von dem Eingangsvektor (Eingangsklon) in den jeweils gewünschten GATEWAY™-Expressionsvektor transferiert (GATEWAY™-Klonierungssystem siehe 4.10)

Zur Überprüfung, ob die bei den LR-Reaktionen erhaltenen Klone auch das jeweils richtige Insert besitzen, wurden von allen Expressionsklonen Verdaus mit Restriktionsenzymen gemacht (siehe S. 147 ff). Hat die LR-Reaktion funktioniert, dann ergab sich ein typisches Bandenmuster: eine Vektorbande und eine oder mehrere Banden, die einzeln bzw. zusammen die Größe des jeweiligen Inserts ergeben mussten.

5.2.2.4.1 Überprüfung der Expressionsklone in dem Yeast-Two-Hybrid-Vektor pBTM116-D9

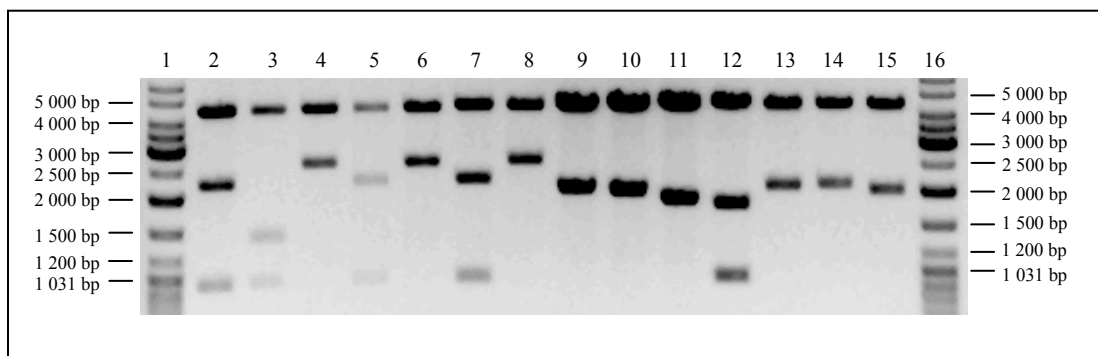


Abbildung 31: Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pBTM116-D9.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 1h bei 150V, 400 mA, 150 W. Je ca. 300 ng gereinigte DNA aus Roboterpräparation verdaut. Verwendete Restriktionsenzyme: Pvu II und Mlu I. Spur 1: Marker; Spur 2: P-wt-FL_D9; Spur 3: P-wt-NT_D9; Spur 4: P-wt-CT_D9; Spur 5: P-289-FL_D9; Spur 6: P-289-CT_D9; Spur 7: P-418-FL_D9; Spur 8: P-418-CT_D9; Spur 9: PIP1_D9; Spur 10: PSMA7-CT_D9; Spur 11: v-Ha-ras_D9; Spur 12: TF_F2-R318_D9; Spur 13: TF_F220-R318_D9; Spur 14: TF_F304-R404_D9; Spur 15: TF_F395-R465_D9; Spur 16: Marker.

Man erkennt die Vektorbande bei ca. 4.5 kb und eine bzw. zwei Banden für das jeweilige Insert. Die Größe der jeweiligen Produkte entspricht dabei den Größen der erwarteten Produkte (siehe Tabelle 11).

In den Spuren 2, 3, 5, 7 und 12 findet man jeweils zwei Banden für das jeweilige Insert. Das bedeutet, dass es in jedem Insert noch eine weitere Schnittstelle, entweder für Pvu II oder Mlu I gibt. Die einzelnen Banden für das Insert ergeben zusammen die Gesamtgröße des Inserts.

5.2.2.4.2 Überprüfung der Expressionsklone in dem Human-Vektor pdECFP-D11

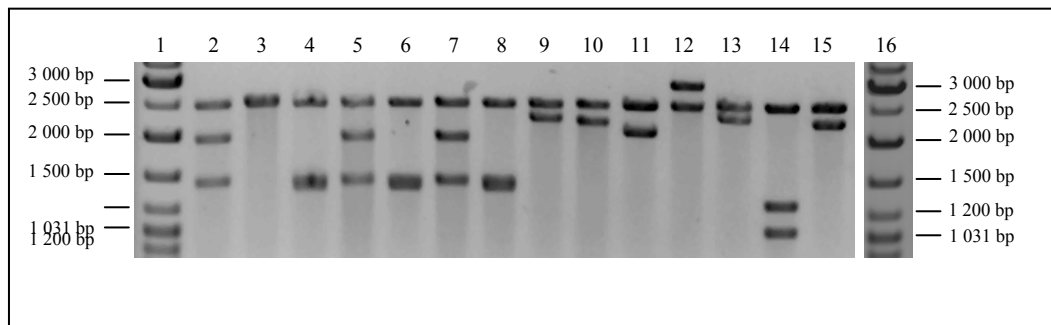


Abbildung 32: Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pdECFP-D11.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 2h bei 100V, 400 mA, 150 W. Je ca. 300 ng gereinigte DNA aus Minipräparationen verdaut. Verwendete Restriktionsenzyme: Stu I und Nhe I. Spur 1: Marker; Spur 2: P-wt-FL_D11; Spur 3: P-wt-NT_D11; Spur 4: P-wt-CT_D11; Spur 5: P-289-FL_D11; Spur 6: P-289-CT_D11; Spur 7: P-418-FL_D11; Spur 8: P-418-CT_D11; Spur 9: PIP1_D11; Spur 10: PSMA7-CT_D11; Spur 11: v-Ha-ras_D11; Spur 12: TF_F2-R318_D11; Spur 13: TF_F220-R318_D11; Spur 14: TF_F304-R404_D11; Spur 15: TF_F395-R465_D11; Spur 16: Marker.

Man erkennt die Vektorbande bei ca. 2.5 kb und eine bzw. mehrere Banden für das jeweilige Insert. Die Größe der jeweiligen Produkte entspricht dabei den Größen der erwarteten Produkte (siehe Tabelle 11).

In den Spuren 3, 4, 6 und 8 handelt es sich um „Doppelbanden“, d.h. es gibt zwei Fragmente von gleicher Größe, die dementsprechend im Gel auf gleicher Höhe liefen.

In Spur 3 ist das Insert etwa genauso groß wie der Vektor.

In den Spuren 4, 6 und 8 ist im Insert noch eine Schnittstelle für eines der beiden Restriktionsenzyme, die so liegt, dass das Insert in zwei gleichgroße Teile geschnitten wurde, die dementsprechend natürlich auch auf der gleichen Höhe im Gel liefen.

5.2.2.4.3 Überprüfung der Expressionsklone in dem Human-Vektor pdEYFP-D12

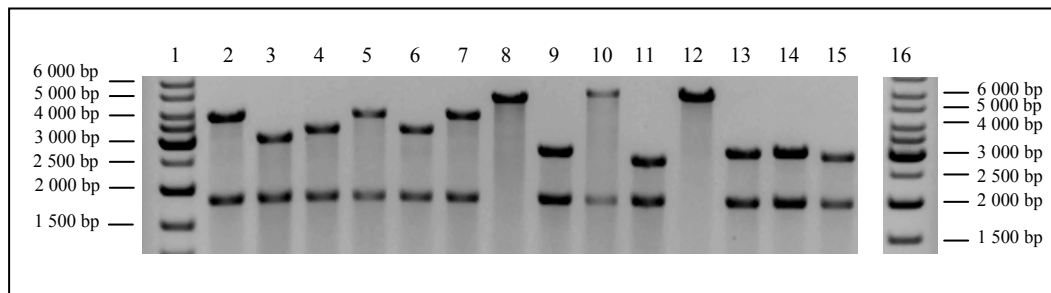


Abbildung 33: Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pdEYFP-D12.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 2h bei 100V, 400 mA, 150 W. Je ca. 300 ng gereinigte DNA aus Minipräparationen verdaut. Verwendete Restriktionsenzyme: Xba I und Bgl II. Spur 1: Marker; Spur 2: P-wt-FL_D12; Spur 3: P-wt-NT_D12; Spur 4: P-wt-CT_D12; Spur 5: P-289-FL_D12; Spur 6: P-289-CT_D12; Spur 7: P-418-FL_D12; Spur 8: P-418-CT_D12; Spur 9: PIP1_D12; Spur 10: PSMA7-CT-D12; Spur 11: v-Ha-ras_D12; Spur 12: TF_F2-R318_D12; Spur 13: TF_F220-R318_D12; Spur 14: TF_F304-R404_D12; Spur 15: TF_F395-R465_D12; Spur 16: Marker.

Man erkennt die Vektorbande bei ca. 1.6 kb und eine Bande für das jeweilige Insert. Die Größe der jeweiligen Produkte entspricht dabei den Größen der erwarteten Produkte (siehe Tabelle 11).

Die Expressionsklone in den Spuren 8, 10 und 12 waren falsch und wurden deshalb noch einmal nachkloniert. Dazu wurde eine neue LR-Reaktion mit DNA der jeweiligen Eingangsklone durchgeführt. Kontrollverdaus der dabei erhaltenen Klone sind in Abbildung 34 gezeigt.

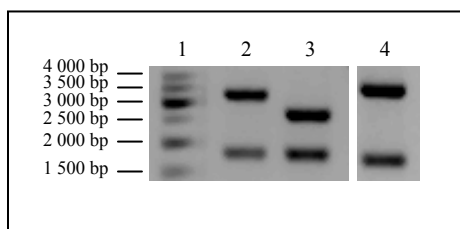


Abbildung 34: Kontrollverdau der nach-klonierten Expressionsklone P-418-CT, PSMA7-CT und TF_F2-R318 in Vektor pdEYFP-D12.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 2h bei 100V, 400 mA, 150 W. Je ca. 300 ng gereinigte DNA aus Minipräparationen verdaut. Verwendete Restriktionsenzyme: Xba I und Bgl II. Spur 1: Marker; Spur 2: P-418-CT_D12; Spur 3: PSMA7-CT-D12; Spur 4: TF_F2-R318_D12.

Man erkennt die Vektorbande bei ca. 1.6 kb und eine Bande für das jeweilige Insert. Die Größe der jeweiligen Produkte entspricht dabei den Größen der erwarteten Produkte (siehe Tabelle 11).

5.2.2.4.4 Überprüfung der Expressionsklone in dem Baculo-Vektor pAcHLT-D46

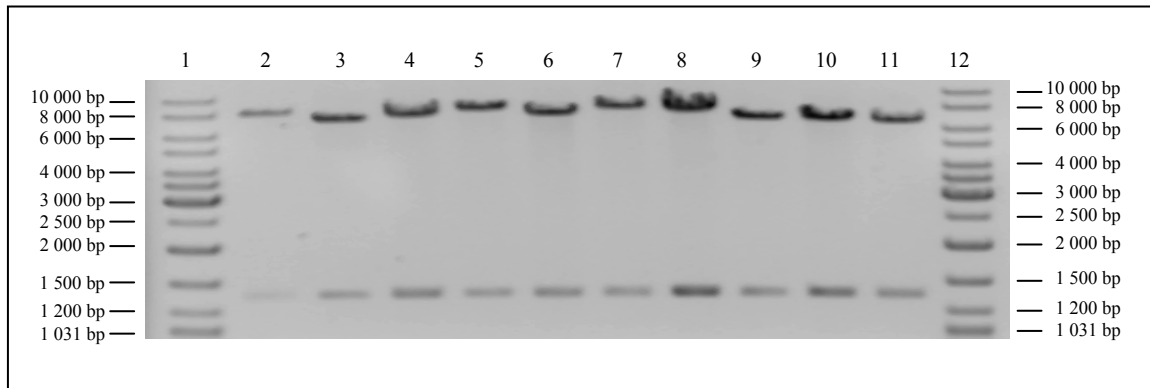


Abbildung 35: Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pAcHLT-D46.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 1h20 bei 100V, 400 mA, 150 W. Je ca. 300 ng gereinigte DNA aus Roboterpräparation verdaut. Verwendetes Restriktionsenzym: Pvu I. Spur 1: Marker; Spur 2: P-wt-FL_D46; Spur 3: P-wt-NT_D46; Spur 4: P-wt-CT_D46; Spur 5: P-289-FL_D46; Spur 6: P-289-CT_D46; Spur 7: P-418-FL_D46; Spur 8: P-418-CT_D46; Spur 9: PIP1_D46; Spur 10: PSMA7-CT_D46; Spur 11: v-Ha-ras_D46; Spur 12: Marker.

Man erkennt in jeder Spur die Vektorbande bei ca. 1.4 kb und eine Bande für das jeweilige Insert. Die Größe der jeweiligen Produkte entspricht dabei den Größen der erwarteten Produkte (siehe Tabelle 11).

5.2.2.4.5 Überprüfung der Expressionsklone in dem Baculo-Vektor pAcG2T-D47

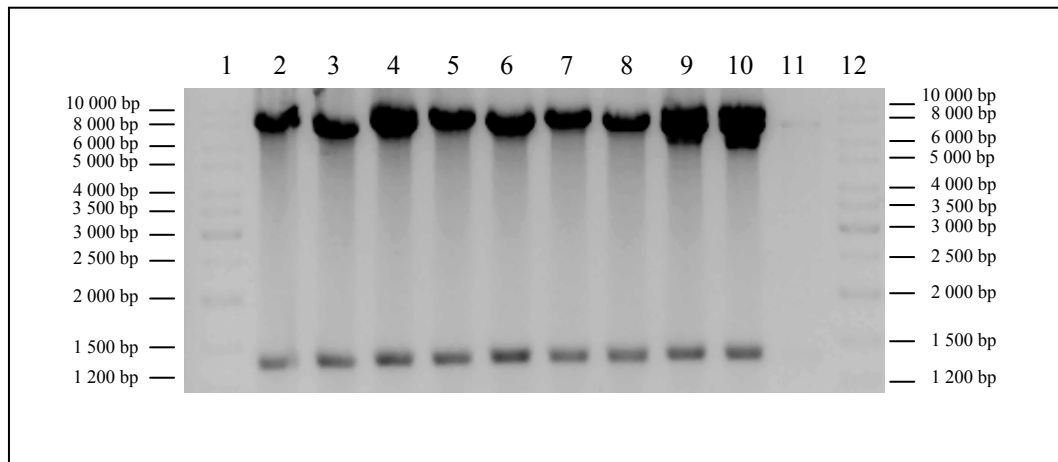


Abbildung 36: Pvu I-Verdau der Expressionsklone in Vektor pAcG2T-D47.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 1h20 bei 100V, 400 mA, 150 W. Es wurden jeweils 300 ng gereinigte DNA aus Roboterpräparation verdaut. Verwendetes Restriktionsenzym: Pvu I. Spur 1: Marker; Spur 2: P-wt-FL_D47; Spur 3: P-wt-NT_D47; Spur 4: P-wt-CT_D47; Spur 5: P-289-FL_D47; Spur 6: P-289-CT_D47; Spur 7: P-418-FL_D47; Spur 8: P-418-CT_D47; Spur 9: PIP1_D47; Spur 10: PSMA7-CT_D47; Spur 11: v-Ha-ras_D47; Spur 12: Marker.

Man erkennt in jeder Spur wieder eine Bande für den Vektor bei ca. 1.4 kb und eine Bande für das jeweilige Insert. Die Größe der jeweiligen Produkte entspricht dabei den Größen der erwarteten Produkte (siehe Tabelle 11).

Konstrukt	Expressionsklone in pBTM116-D9	Expressionsklone in pDECFP-D11	Expressionsklone in pEYFP-D12	Expressionsklone in pAcHLT-D46	Expressionsklone in pAcG2T-D47
	Verdau mit Pvu II / Mlu I	Verdau mit Stu I / Nhe I	Verdau mit Xba I / Bgl II	Verdau mit Pvu I	Verdau mit Pvu I
	erwartete Banden bei [bp]	erwartete Banden bei [bp]	erwartete Banden bei [bp]	erwartete Banden bei [bp]	erwartete Banden bei [bp]
P-wt-FL	4 490 + 3 340	2 510 + 3 440	1 600 + 4 070	1 370 + 8 240	1 370 + 8 660
P-wt-NT	4 490 + 2 520	2 510 + 2 620	1 600 + 3 250	1 370 + 7 420	1 370 + 7 840
P-wt-CT	4 490 + 2 790	2 510 + 2 870	1 600 + 3 500	1 370 + 7 670	1 370 + 8 100
P-289-FL	4 490 + 3 340	2 510 + 3 440	1 600 + 4 070	1 370 + 8 240	1 370 + 8 660
P-289-CT	4 490 + 2 790	2 510 + 2 870	1 600 + 3 500	1 370 + 7 670	1 370 + 8 100
P-418-FL	4 490 + 3 340	2 510 + 3 440	1 600 + 4 070	1 370 + 8 240	1 370 + 8 660
P-418-CT	4 490 + 2 790	2 510 + 2 870	1 600 + 3 500	1 370 + 7 670	1 370 + 8 100
PIP	4 490 + 2 230	2 510 + 2 330	1 600 + 2 960	1 370 + 7 130	1 370 + 7 550
PSMA7-CT	4 490 + 2 150	2 510 + 2 250	1 600 + 2 880	1 370 + 7 050	1 370 + 7 470
v-Ha-ras	4 490 + 2 010	2 510 2 110	1 600 + 2 740	1 370 + 6 910	1 370 + 7 330
TF_F2-R318	4 490 + 2 870	2 510 + 2 970	1 600 + 3 600	1 370 + 7 790	1 370 + 8 190
TF_F220-R318	4 490 + 2 220	2 510 + 2 320	1 600 + 2 950	1 370 + 7 120	1 370 + 7 540
TF_F304-R404	4 490 + 2 20	2 510 + 2350	1 600 + 2 980	1 370 + 7 150	1 370 + 7 570
TF_F395-R465	4 490 + 2 170	2 510 + 2 270	1 600 + 2 900	1 370 + 7 070	1 370 + 7 490

Tabelle 11: Erwartete Grössen bei den verschiedenen Kontrollverdaus der Expressionsklone in den unterschiedlichen Expressionsvektoren.

Bei der Berechnung der Grössen wurde angenommen, dass die Inserts keine weiteren zusätzlichen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme besitzen.

5.3 Klonierung der Parkin-Konstrukte und des Fragmentes der 26S proteasomalen Untereinheit alpha4 über die klassische Restriktionsklonierung

Aufgrund des bei der Immunfluoreszenz aufgetretenen Problems, dass der YFP-Tag des Fragmentes der proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT-D12) anscheinend ein Lokalisationssignal blockiert und das Protein demzufolge ausschließlich in den Kern transportiert wird, wurden die beiden Vektoren pCMV-Myc und pCMV-HA als Alternativen ausgewählt. Diese beiden Vektoren stammten aus der Gruppe von Dr. Rainer Pepperkok (EMBL Heidelberg). Aus zeitlichen Gründen wurde darauf verzichtet für das einzelne PSMA7-CT-Konstrukt die beiden Vektoren umzuklonieren und GATEWAYTM-kompatibel zu machen.

Für die Klonierung der Parkin-Konstrukte und des Fragmentes der 26S proteasomalen Untereinheit alpha4 in den Nicht-GATEWAYTM-kompatiblen Vektor pACT2 per Schnittstellenklonierung über Sal I/Not I wurden sowohl der Vektor pACT2 als auch alle Parkin- und PSMA7-Konstrukte einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen Sal I und Not I unterzogen. Die Verdau wurde in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus den Gelstücken eluiert. Die verschiedenen Parkin- und PSMA7-Konstrukte wurden in den durch den Verdau linearisierten Vektor ligiert.

Zur Überprüfung der Inserts der hervorgegangenen Klone wurde ein Sal I/Not I-Verdau gemacht.

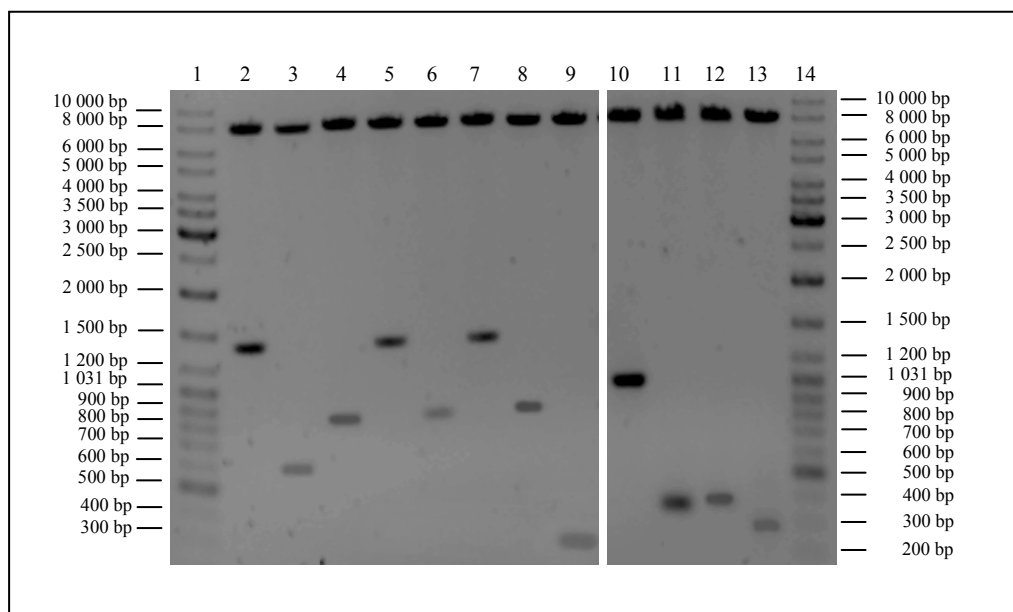


Abbildung 37: Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pACT2.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 1h bei 150V, 400 mA, 150 W. Je ca. 300 ng gereinigte DNA aus Roboterpräparation verdaut. Verwendete Restriktionsenzyme: Sal I und Not I. Spur 1: Marker; Spur 2: P-wt-FL_pACT2; Spur 3: P-wt-CT_pACT2; Spur 4: P-wt-NT_pACT2; Spur 5: P-289-FL_pACT2; Spur 6: P-289-CT_pACT2; Spur 7: P-418-FL_pACT2; Spur 8: P-418-CT_pACT2; Spur 9: PSMA7-CT_pACT2; Spur 10: TF_F2-R318_pACT2; Spur 11: TF_F220-R318_pACT2; Spur 12: TF_F304-R404_pACT2; Spur 13: TF_F395-R465_pACT2; Spur 14: Marker.

Man erkennt die Vektorbande bei ca. 8.1 kb und eine Bande für das jeweilige Insert. Die Größe der jeweiligen Produkte entspricht dabei den Größen der erwarteten Produkte (siehe Tabelle 12).

Expressionsklone in pACT2			
Verdau mit Sal I / Not I			
Konstrukt	Insert-Größe incl. <i>attB</i> -Rekombinationsstellen [bp]	Vektor + Insert [bp]	erwartete Banden bei [bp]
P-wt-FL	1 470	9 580	8 110 + 1 460
P-wt-NT	650	8 760	8 110 + 640
P-wt-CT	900	9 010	8 110 + 890
P-289-FL	1 470	9 580	8 110 + 1 460
P-289-CT	900	9 010	8 110 + 890
P-418-FL	1 470	9 580	8 110 + 1 460
P-418-CT	900	9 010	8 110 + 890
PSMA7-CT	280	8 390	8 110 + 270
TF_F2-R318	1 000	9 110	8 110 + 990
TF_F220-R310	350	8 460	8 110 + 340
TF_F304-R404	380	8 490	8 110 + 370
TF_F395-R465	300	8 410	8 110 + 290

Tabelle 12: Erwartete Größen beim Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pACT2 mit den Restriktionsenzymen Sal I und Not I.

attB-Rekombinationsstellen: 50 bp (*attB*1 = 25 bp + *attB*2 = 25 bp)

Die Größen in der Spalte „erwartete Banden bei [bp]“ werden so berechnet, als würde das Insert keine Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Sal I und Not I besitzen.

Für die Klonierung des PSMA7-CT-Fragmentes in die beiden Nicht-GATEWAY™-kompatiblen Vektoren pCMV-Myc und pCMV-HA per Schnittstellenklonierung über Eco RI/Xho I wurden sowohl die beiden Vektoren als auch das PSMA7-CT-Konstrukt einem Doppelverdau mit den beiden Restriktionsenzymen Eco RI und Xho I unterzogen. Die Verdau wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gelstück eluiert. Das PSMA7-CT-Konstrukt wurde in jeden der beiden linearisierten/geöffneten Vektoren ligiert. Zur Überprüfung des Inserts wurde ein Eco RI/Xho I-Verdau gemacht.

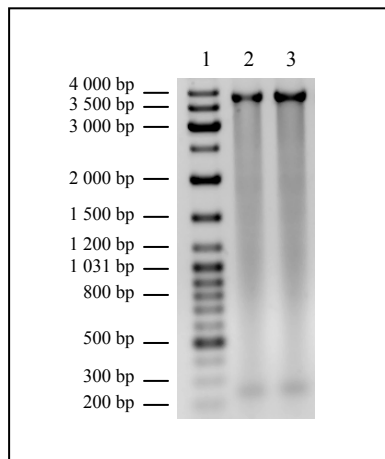


Abbildung 38: Kontrollverdau von PSMA7-CT in Vektor pCMV-Myc und in Vektor pCMV-HA.

1 %iges Agarosegel (1x TAE als Laufpuffer). Elektrophorese: 1h bei 75V, 400 mA, 150 W. Je ca. 300 ng gereinigte DNA aus Minipräparation verdaut. Verwendete Restriktionsenzyme: Eco RI und Xho I. Spur 1: Marker; Spur 2: PSMA7-CT_pCMV-Myc; Spur 3: PSMA7-CT_pCMV-HA.

Man erkennt jeweils die Vektorbande und die Bande für das PSMA7-CT-Insert. Die Größe des Produktes entspricht dabei der Größe des erwarteten Produktes: ca. 3.8 kb für den pCMV-Myc-Vektor bzw. für den Vektor pCMV-HA und jeweils die Bande für PSMA7-CT bei 230 bp.

5.4 Expression der beteiligten Proteine im Baculovirus Expression Vector System (BEVS)

Die Pull Down-Experimente und die Größenausschluss-Chromatographie wurden mit in Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* Sf9 exprimierten Proteinen durchgeführt werden. Der Grund für die Verwendung dieses Expressionssystems lag darin, dass Insekten als Eukaryonten viele der posttranslationalen Modifikationen machen, die auch beim Menschen stattfinden. Damit ist gewährleistet, dass die in den Insektenzellen exprimierten Proteine ihre biologische Aktivität besitzen.

Um die gewünschten Proteine in den Insektenzellen zu exprimieren, wurden die Zellen mit rekombinanten Baculoviren infiziert.

Die Herstellung der verschiedenen rekombinanten Baculoviren erfolgte durch Co-Transfektion (Lipofektion) von adhärenenten Insektenzellen mit linearisierter Baculovirus-DNA und der DNA des jeweils gewünschten Parkin- bzw. PSMA7-Konstruktes. Die Konstrukte lagen als GATEWAYTM-Expressionsklone sowohl in dem Vektor pAcHLT-D46 und als auch in dem Vektor pAcG2T-D47 vor. Mit den aus der Lipofektion erhaltenen rekombinanten Baculoviren wurde eine sog. Erst-Amplifikation zur Vermehrung der rekombinanten Baculoviren gemacht. Mit rekombinanten Baculoviren aus der Erst-Amplifikation wurden in einer sog. Zweit-Amplifikation weitere Insektenzellen infiziert, um noch einmal eine Anreicherung der rekombinanten Baculoviren zu erhalten. Mit rekombinanten Baculoviren aus den Zweit-Amplifikationen wurden Sf9-Insektenzellen zur Proteinexpression infiziert. (Baculovirus Vector Expression System siehe 4.13)

Einen Hinweis darauf, ob eine Infektion der Insektenzellen mit den rekombinanten Baculoviren stattgefunden hat, liefert die visuelle Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop.

Infizierte Insektenzellen sind größer als nicht-infizierte, deutlich abgerundet und weniger adhärenent. Außerdem haben sie ihre Teilungsrate sichtlich reduziert.

Im Vergleich dazu sind nicht-infizierte Insektenzellen kleiner, sehr adhärenent und in der gleichen Zeit bei gleicher Ausgangszellzahl wesentlich stärker gewachsen.

Abbildung 39 zeigt Mikroskopie-Aufnahmen von nicht-infizierten und mit Baculoviren infizierte Sf9-Insektenzellen, an denen man den Unterschied sehen kann.

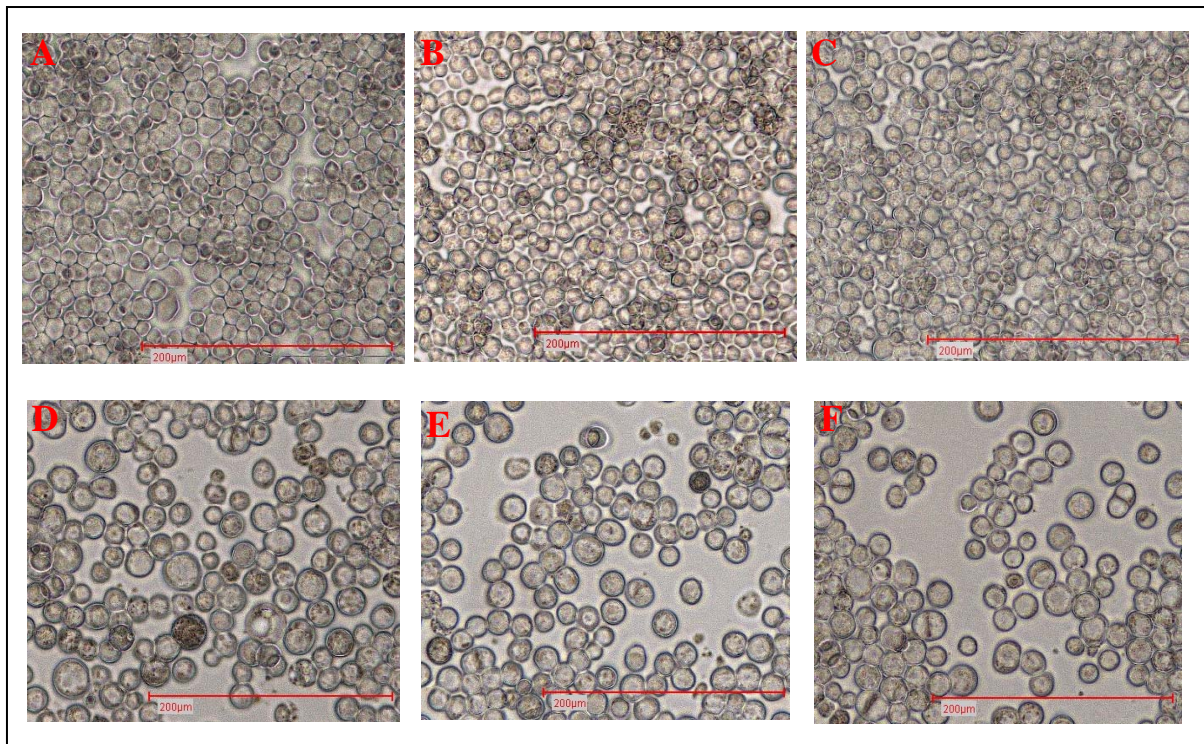


Abbildung 39: Optischer Vergleich von nicht-infizierten und mit Baculoviren infizierten Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* Sf9.

In Petrischalen (94 x 16 mm) wurden $6,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Bei den mit Baculoviren zu infizierenden Ansätzen wurden jeweils 50 µL Erstamplifikation eines rekombinanten Baculovirus zugegeben. Die Petrischalen wurden dann in eine Plastikbox gestellt, die mit nassen Papiertüchern ausgelegt war, damit das Medium nicht verdunstet und die Zellen austrocknen. Inkubiert wurde bei 27°C-Grad für 4 Tage. **A-C**: Nicht-infizierte *Spodoptera frugiperda* Sf9-Zellen. **D-F**: Mit rekombinanten Baculoviren infizierte *Spodoptera frugiperda* Sf9-Zellen.

Mikroskopie-Einstellungen: Durchlicht, Filter 1 (= ohne Filter), 10x Okkular

Abbildung 39 A, B und C zeigt nicht-infizierte Sf9-Insektenzellen.

Die Zellen sind adhärent und dicht gewachsen, d.h. nichts scheint ihre Wachstumsrate negativ beeinflusst zu haben.

In Abbildung 39 D, E und F sieht man dagegen deutlich, dass es sich um infizierte Sf9-Insektenzellen handelt. Sie sind größer und abgerundet. Die Zellen sind auch weniger dicht gewachsen im Vergleich zu den nicht-infizierten Sf9-Zellen (obwohl sie mit der gleichen Zellzahl ausgesät wurden), da die Infektion mit Baculoviren die Teilungsrate herabsetzt.

5.5 Nachweis der Interaktion von Parkin und dem carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4 über Pull Down-Experimente

Für die Pull Down-Experimente wurden verschiedene GST-gereinigte Parkin-Konstrukte verwendet, und Lysat des zu untersuchenden 6x His-getaggtten Interaktionspartners PSMA7-CT.

Zu den Parkin-Konstrukten gehörten die drei Wildtyp-Konstrukte P-wt-FL (Volllängenkonstrukt), P-wt-NT (amino-terminales Fragment) und P-wt-CT (carboxy-terminales Fragment), sowie die beiden Konstrukte der C418R-Mutante, P-418-FL (Volllängenkonstrukt) und P-418-CT (carboxy-terminales Fragment).

5.5.1 Reinigung von Parkin-GST-Fusionsproteinen für die Pull Down-Experimente

Die exprimierten Parkin-GST-Fusionsproteine (in Vektor pAcG2T-D47) wurden über ihren N-terminalen GST-Tag gereinigt.

Die Reinigung erfolgte über die Bindung des GST-Tags der Proteine an GSH-Agarosebeads. Nach mehreren Waschschritten wurden die gebundenen Proteine mit 10 mM reduziertem Glutathion von den GSH-Agarosebeads eluiert.

Um zu überprüfen, ob die Reinigung erfolgreich war, wie rein die Proteine sind und ob die Proteine vielleicht schon Abbau zeigen, wurden Proben von allen Elutionsfraktionen genommen und anhand von Coomassiegelen analysiert.

Coomassiegele einiger Reinigungen sind in Abbildung 40 exemplarisch dargestellt.

Teilweise wurden zusätzlich zu den Proben der einzelnen Elutionen noch Proben vom Durchlauf und der GST-Agarosebeads (nur bei Gel C: Reinigung des C-terminalen Fragmentes des Wildtyps) aufgetragen, um zu sehen, wie gut die Bindung an die Beads bzw. wie gut die anschließende Elution funktioniert hatte.

In den beiden Gelen, in denen noch jeweils der Durchlauf mit aufgetragen wurde (Gel A: Spur 2, 8, und 14 und Gel C: Spur 3) sind keine signifikanten Banden in Höhe des jeweils gereinigten Proteins zu sehen. D.h. zuerst einmal, dass die Bindung funktioniert hat und dass die Menge der eingesetzten GSH-Agarosebeads ausreichte, um den Großteil an exprimiertem Protein zu binden.

Bei dem Gel für das gereinigte carboxy-terminale Fragment der Parkin-Mutante C418R (P-418-CT), dem Gel C, wurde zusätzlich noch, nach Beendigung der Elution, eine Probe der GSH-Agarosebeads genommen und mit aufgetragen (Spur 2). Dabei fanden sich noch Reste von gebundenem GST-Fusionsprotein an den eingesetzten Beads.

In diesem Gel wurden außerdem noch Proben der zwei Waschschriffe mit den beiden Waschpuffern (Wash I und Wash II) aufgetragen (Gel C: Spur 4 und 5). Die Waschschriffe wurden gemacht, um unspezifisch gebundene Lysat-Bestandteile zu entfernen. Anhand der Proben dieser Waschschriffe kann man sehen, ob mit den unspezifisch gebundenen

Bestandteilen auch GST-Fusionsprotein runtergewaschen wird.
In Waschpuffer Wash I (Spur 4) findet man geringe Mengen an ungebundenem Protein.

Gel A zeigt in den Spuren 4 bis 6 Proben der Eluate des Volllängenkonstruktes vom Parkin-Wildtyp (P-wt-FL), in den Spuren 10 bis 12 Elutionsproben des gereinigten amino-terminalen Fragmentes des Wildtyps (P-wt-NT) und in den Spuren 15 bis 18 Proben der Eluate des carboxy-terminalen Fragmentes des Wildtyps (P-wt-CT).

Die Banden für jedes gereinigte Protein befinden sich jeweils in der erwarteten Höhe. Das Volllängenkonstrukt besitzt als GST-Fusionsprotein eine Größe von etwa 79 kDa, das N-terminale Fragment ca. 49 kDa und das C-terminale Konstrukt eine Größe von etwa 58 kDa.

Die beiden Gele B und C zeigen Proben der Eluate der beiden Konstrukte für die Parkin-Mutante C418R.

In Gel B sind die Elutionsproben des gereinigten Volllängenkonstruktes der Mutante (P-418-FL) aufgetragen. Wie das Volllängenkonstrukt des Wildtyps besitzt das Volllängenkonstrukt der Mutante eine Größe von ungefähr 79 kDa. Die Banden findet man in der entsprechenden Höhe.

Die Spuren 6 bis 11 in Gel C zeigen Proben der Eluate des carboxy-terminalen Fragmentes dieser Mutante. Als GST-Fusionsprotein besitzt es mit etwa 58 kDa die gleiche Größe wie das C-terminale Fragment des Wildtyps als GST-Fusionsprotein (P-wt-CT). Die Bande ist auf der entsprechenden Höhe im Gel zu finden.

Neben den Banden für das jeweils gereinigte GST-Fusionsprotein, findet man in den Gelen auch noch immer eine Bande in der Höhe der 25 kDa-Markerbande.

Nach einer Affinitäts-Reinigung an immobilisiertem Glutathion enthalten GST-Fusionsproteine, die aus Insekten-Zellen stammen, immer noch veränderliche Mengen an „Protein-Kontaminanten“ mit einer Größe von 23 – 24 kDa. Es handelt sich dabei um *Glutathione-binding proteins* (GlutBP), die endogen in Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*) sind.

(P. Bichet *et al.*, 2000)

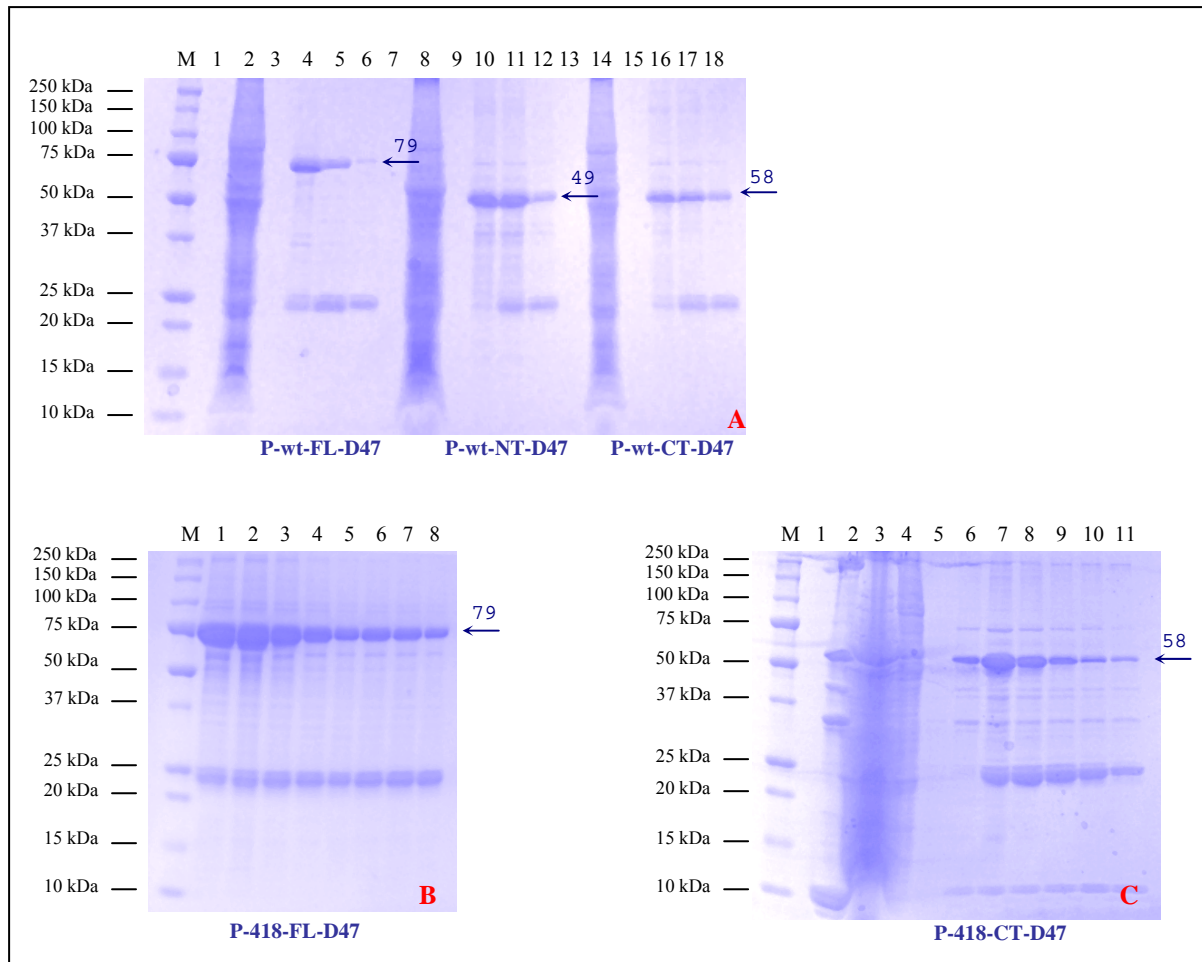


Abbildung 40: Coomassie-Gele von aus Sf9-Zelllysaten gereinigten GST-Fusionsproteinen.

Coomassiegele folgender Reinigungen: **Gel A:** P-wt-FL-D47 (Spur 1 – 6), P-wt-NT-D47 (Spur 8 – 12) und P-wt-CT-D47 (Spur 14 – 18); **Gel B:** P-418-FL-D47; **Gel C:** P-418-CT-D47

Von jeder Elutions-Fraktion 10 µL Probe mit 5 µL 3x SDS-Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95°C aufgekocht und auf 10-20 %iges Criterion™ Tris-HCl-Gradientengel (1x TGS-Laufpuffer) aufgetragen. Elektrophorese: 400 mA, 200 V, 150 W für 1 h. Gel nach Beendigung des Laufes gut gewässert und anschließend in Coomassie-Lösung (BioSafe™ Coomassie Blue von BioRad) gefärbt.

Beladungsplan Gel A: M: Marker; Spur 1: Wasser; Spur 2: P-wt-FL-D47 Durchlauf; Spur 3: Wasser; Spur 4: P-wt-FL-D47 Elution 2; Spur 5: P-wt-FL-D47 Elution 3; Spur 6: P-wt-FL-D47 Elution 4; Spur 7: Wasser; Spur 8: P-wt-NT-D47 Durchlauf; Spur 9: Wasser; Spur 10: P-wt-NT-D47 Elution 2; Spur 11: P-wt-NT-D47 Elution 3; Spur 12: P-wt-NT-D47 Elution 4; Spur 13: Wasser; Spur 14: P-wt-CT-D47 Durchlauf; Spur 15: Wasser; Spur 16: P-wt-CT-D47 Elution 2; Spur 17: P-wt-CT-D47 Elution 3; Spur 18: P-wt-CT-D47 Elution 4.

Beladungsplan Gel B: M: Marker; Spur 1: P-418-FL-D47 Elution 1; Spur 2: P-418-FL-D47 Elution 2; Spur 3: P-418-FL-D47 Elution 3; Spur 4: P-418-FL-D47 Elution 4; Spur 5: P-418-FL-D47 Elution 5; Spur 6: P-418-FL-D47 Elution 6; Spur 7: P-418-FL-D47 Elution 7; Spur 8: P-418-FL-D47 Elution 8.

Beladungsplan Gel C: M: Marker; Spur 1: Wasser; Spur 2: P-418-CT-D47 Beads; Spur 3: P-418-CT-D47 Durchlauf; Spur 4: P-418-CT-D47 Wash I; Spur 5: P-418-CT-D47 Wash II; Spur 6: P-418-CT-D47 Elution 2; Spur 7: P-418-CT-D47 Elution 3; Spur 8: P-418-CT-D47 Elution 4; Spur 9: P-418-CT-D47 Elution 5; Spur 10: P-418-CT-D47 Elution 6; Spur 11: P-418-CT-D47 Elution 7.

Durchlauf: alles, was nicht an die Agarosebeads gebunden hat

Wash I: Tween 20-haltiger Puffer zum Waschen der Agarosebeads vor Waschschritt mit Puffer Wash II

Wash II: Puffer zum Waschen der Agarosebeads vor Elutionsbeginn; ohne Tween 20

← : Markierung der Bande des gereinigten Proteins. Die Zahl über dem Pfeil gibt das Molekulargewicht des jeweils gereinigten Proteins in [kDa] an

5.5.2 Herstellung des Lysates des His-getaggtten Interaktionspartners, dem carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4

Die Herstellung des Lysates des Interaktionspartners, dem C-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4, als 6x His-Fusionsprotein (PSMA7-CT) erfolgte in T175-Zellkulturflaschen mit jeweils 3×10^7 Sf9-Zellen als Ausgangszellzahl und mit rekombinanten Baculoviren für das C-terminale alpha4-Fragment als 6x His-Fusionsprotein (PSMA7-CT) infiziert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet. Das Zellpellet in 1x PBS-Puffer resuspendiert, dem Protease-Inhibitoren und Beta-Mercaptoethanol zugesetzt waren. Die resuspendierten Zellen wurden mit Hilfe eines Handhomogenisators aufgebrochen.

Die Expression des Proteins wurde anhand von Western Blots überprüft (exemplarisch für zwei Expressionsansätze in Abbildung 41 dargestellt).

Erwartet wurde bei erfolgreicher Expression eine signifikante Bande in der entsprechenden Höhe. Eigentlich würde man für PSMA7-CT-D46 eine Bande auf Höhe der 10 kDa-Markerbande erwarten, da das Protein als 6x His-Fusionsprotein eine Größe von ca. 9 kDa besitzt. Allerdings läuft das Protein höher, im Bereich der 15 kDa-Markerbande.

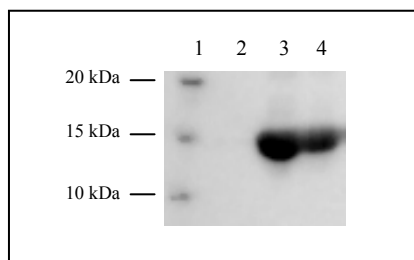


Abbildung 41: Überprüfung der Expression von PSMA7-CT-D46.

Von zwei Ansätzen aus je fünf T175-Flaschen jeweils 3 mL der infizierten Zellsuspension als Probe genommen. Zellen abzentrifugiert. Zugabe von 100 μ L 3x SDS-Probenpuffer, 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und 30 μ L auf 10-20 %iges Gradientengel aufgetragen. Elektrophorese: 400 mA, 200 V, 150 W für 1 h. Blotten: 1000 mA, 100 V, 150 W für 1 h.

Beladungsplan: Spur 1: Marker; Spur 2: Wasser; Spur 3: PSMA7-CT-D46 (Expressionsprobe 1); Spur 4: PSMA7-CT-D46 (Expressionsprobe 2).

D46: GATEWAYTM Expressionsvektor pAcHLT-D46; besitzt 6x His-Tag

5.5.3 Wildtyp- und Mutations-Konstrukte interagieren mit dem carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4

Da nach bisherigen Informationen nach Immunpräzipitation von überexprimiertem Parkin das 26S oder 20S Proteasom nicht detektiert werden konnte, die Co-Präzipitation von Parkin mit dem Proteasom dagegen aber gezeigt werden konnte (J.C. Dächsel *et al.*, 2005; E. Sakata *et al.*, 2003), gab es zwei verschiedene Ansätze, um zu sehen, ob es tatsächlich einen Unterschied macht, mit welchem Bindungspartner präzipitiert wird.

Aus diesem Grund wurde einmal über den GST-Tag der Parkin-Konstrukte präzipitiert. D.h. es erfolgte zuerst die Bindung der gereinigten GST-getaggen Parkin-Konstrukte an GSH-Agarosebeads, und dann erst die Zugabe des 6x His-getaggen Interaktionspartners PSMA7-CT in Form von Lysat.

Bei dem anderen Ansatz wurde über den 6x His-Tag des PSMA7-CT-Fragmentes präzipitiert. D.h. es erfolgte zuerst die Bindung des in dem Lysat enthaltenen 6x His-getaggen PSMA7-CT, und dann erst die Zugabe der verschiedenen GST-gereinigten Parkin-Konstrukte.

Beim Präzipitieren über den GST-Tag wurden jeweils 40 µg gereinigtes Protein der Parkin-Konstrukte mit 100 µL GSH-Agarosebeads für etwa drei Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die GSH-Agarosebeads abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nun erfolgte die Zugabe von je 75 µL des 6x His-getaggen PSMA7-CT-Lysates. Das Ganze wurde über Nacht bei 4°C miteinander inkubiert. Am nächsten Tag wurden die GSH-Agarosebeads abzentrifugiert und mehrmals mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Agarosebeads wurden mit 75 µL 3x SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht.

Bei der Präzipitation über den 6x His-Tag wurden jeweils 75 µL des 6x His-getaggen PSMA7-CT-Lysates 100 µL NiNTA-Sepharosebeads für etwa drei Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die NiNTA-Sepharosebeads abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nun erfolgte die Zugabe von je 40 µg gereinigtes Protein der Parkin-Konstrukte. Das Ganze wurde über Nacht bei 4°C miteinander inkubiert. Am nächsten Tag wurden die NiNTA-Sepharosebeads abzentrifugiert und mehrmals mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Sepharosebeads wurden mit 75 µL 3x SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht.

Mit diesem Versuchsaufbau sollten bei dem mit dem GST-Antikörper behandelten Western Blot (Abbildung 42 A, Spur 10 – 14) nur dort Banden zu sehen sein, wo eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen stattgefunden hatte.

Das Fragment der proteasomalen Untereinheit PSMA7-CT wurde über seinen 6x His-Tag mit NiNTA-Sepharosebeads *gefished*. Da bei dieser Western Blot-Membran Proteine über einen GST-Antikörper nachgewiesen wurden, konnten detektierte Banden nur daher rühren, dass Parkin als GST-Fusionsprotein an das NiNTA-Sepharosebeads immobilisierte PSMA7-CT gebunden hatte.

Dementsprechend konnten bei dem zweiten Ansatz, bei dem die Parkin-Proteine über ihren GST-Tag an GSH-Agarosebeads immobilisiert wurden und bei dem die Membran mit einem His-Antikörper behandelt wurde, Banden nur dort detektiert werden, wenn das 6x His-getaggte PSMA7-CT-Protein an das *gefischte* Parkin-GST-Fusionsprotein gebunden hatte.

Um zu überprüfen, ob die Antikörper eine unspezifische Bindung an die Beads selbst haben, wurden zur Kontrolle GSH-Agarosebeads und NiNTA-Sepharosebeads mit auf die Gele aufgetragen.

Um zu überprüfen, ob der 6x His-getaggte Interaktionspartners PSMA7-CT unspezifisch an GSH-Agarosebeads bindet, wurde Lysat des 6x His-PSMA7-CT-Fusionsproteins mit GSH-Agarosebeads inkubiert.

Aus dem gleichen Grund, um zu überprüfen, ob die gereinigten GST-Parkin-Fusionsproteine unspezifische Bindung an NiNTA-Sepharosebeads aufweisen, wurden die gereinigten Proteine mit NiNTA-Sepharosebeads inkubiert.

Um sicherzugehen, dass gereinigte GST-Parkin-Fusionsproteine vorhanden sind und um einen Vergleich der eingesetzten Mengen zu bekommen (Bradford-Bestimmung ungenau; außerdem fallen die Protein bei der Lagerung aus, was die vorher gemessene Konzentration wieder verändert/), wurden die GST-Parkin-Proteine ohne vorherige Inkubation mit dem Interaktionspartner auf das Gel aufgetragen, dessen Membran später mit dem GST-Antikörper behandelt wurde.

Um zu überprüfen, ob in dem Lysat überhaupt das gewünschte Protein PSMA7-CT-D46 exprimiert wurde, wurde eine Probe Lysat in der gleichen Menge wie sie auch bei den Interaktionsansätzen eingesetzt wurde, auf das Gel aufgetragen, dessen Membran später mit dem His-Antikörper behandelt wurde.

Die Kontrollen mit den leeren Beads zeigten keinerlei unspezifischen Bindungen der Antikörper (siehe Abbildung 42: jeweils Spur 2 und 3 in beiden Western Blots).

Auch konnte weder eine unspezifische Bindung des 6x His-Interaktionspartners PSMA7-CT mit den GSH-Agarosebeads festgestellt werden (siehe Abbildung 42 A: Spur 4), noch eine unspezifische Bindung der gereinigten GST-Parkin-Fusionsproteine an NiNTA-Sepharosebeads (siehe Abbildung 42 B: Spur 5 – 9).

Die Membran, die mit dem GST-Antikörper behandelt worden war (A), zeigt eindeutig, dass alle gereinigten GST-Parkin-Fusionsproteine vorhanden waren (siehe Abbildung 42 A: Spuren 5 – 9).

In den Spuren 5 und 8 findet man jeweils in Höhe der 75 kDa-Bande eine deutliche Bande für das Volllängenkonstrukt des Wildtyps (Spur 5) bzw. der Parkin-Mutante C418R (Spur 9). Beide Volllängenkonstrukte besitzen als GST-Fusionsproteine eine Größe von ca. 79 kDa. In Spur 6 ist in Höhe der 50 kDa-Markerbande ein deutliche Bande für das amino-terminale Fragment des Wildtyps zu erkennen, das eine Größe von etwa 49 kDa aufweist. In den beiden Spuren 7 und 9 ist in einer Höhe zwischen der 50 kDa- und 75 kDa-Markerbande jeweils eine Bande für das carboxy-terminale Fragment des Wildtyps (Spur 7) bzw. der Parkin-Mutante C418R (Spur 9) zu erkennen. Beide Proteien besitzen eine Größe von etwa 58 kDa.

Anhand des His-Blotes (B) ist ebenfalls deutlich zu sehen, dass in dem Lysat PSMA7-CT exprimiert wurde (siehe Abbildung 42 B: Spur 4). Es ist eine eindeutige Bande auf Höhe der 15 kDa-Markerbande zu sehen.

Die GST-Membran (A) zeigt, dass mit Ausnahme des amino-terminalen Fragmentes (P-wt-NT) alle Parkin-Konstrukte an das Fragment der proteasomalen Untereinheit PSMA7-CT gebunden haben (siehe Abbildung 42 A: Spur 10, 12 – 14).

Bei dem His-Western Blot (B) findet man dagegen nicht nur bei dem N-terminalen Fragment des Parkin-Wildtyps (P-wt-NT) keine Interaktion (siehe Abbildung 42 B: Spur 11), sondern auch keine bei dem carboxy-terminalen Fragment der Parkin-Mutante C418R (P-418-CT) (siehe Abbildung 42 B: Spur 11 und 14).

Banden und damit Interaktionen mit PSMA7-CT zeigen sich nur bei den beiden Volllängenkonstrukten von Wildtyp (P-wt-FL) und C418R-Mutante (P-418-FL), und bei dem carboxy-terminalen Fragment des Parkin-Wildtyps (P-wt-CT) (siehe Abbildung 42 B: Spur 10, 12 und 13).

Parkin-Konstrukt	GST-Blot	His-Blot
P-wt-FL-D47	+	+
P-wt-NT-D47	-	-
P-wt-CT-D47	+	+
P-418-FL-D47	+	+
P-418-CT-D47	+	-

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der Pull Down-Experimente.

+ : Interaktion von Parkin mit PSMA7-CT-D46

- : keine Interaktion

D46: GATEWAYTM Expressionsvektor pAcHLT-D46; besitzt 6x His-Tag

D47: GATEWAYTM Expressionsvektor pAcG2T-D47; besitzt GST-Tag

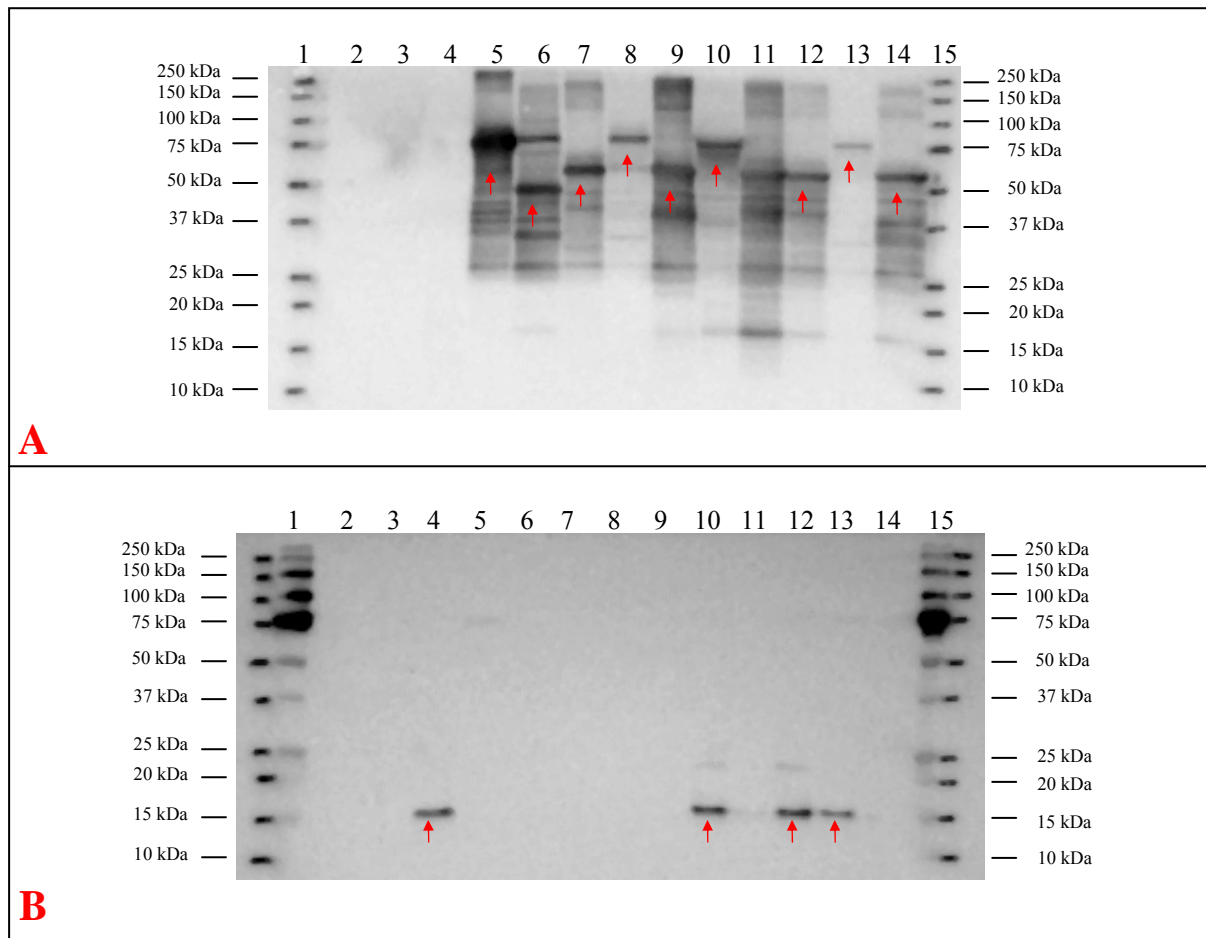


Abbildung 42: Western Blot-Membranen des Pull Down-Experimentes.

A: Western Blot Membran mit GST-Antikörper

PSMA7-CT_D46-Lysat an NiNTA-Sepharosebeads gebunden, dann Zugabe von gereinigtem GST-Fusionsprotein der verschiedenen Parkin-Konstrukte. Inkubation über Nacht bei 4°C auf Rollinkubator. Waschen der Beads. Zugabe von 3x SDS-Probenpuffer, 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Probe auf 10-20%iges Gradientengel (1x TGS-Laufpuffer) aufgetragen. Elektrophorese: 400 mA, 200 V, 150 W für 1 h. Blotten: 1000 mA, 100 V, 150 W für 1 h.

Beladungsplan: Spur 1: Marker; Spur 2: GSH-Agarosebeads; Spur 3: NiNTA-Sepharosebeads; Spur 4: PSMA7-CT_D46 (GSH-gefished); Spur 5: P-wt-FL_D47 (gereinigtes Protein); Spur 6: P-wt-NT_D47 (gereinigtes Protein); Spur 7: P-wt-CT_D47 (gereinigtes Protein); Spur 8: P-418-FL_D47 (gereinigtes Protein); Spur 9: P-418-CT_D47 (gereinigtes Protein); Spur 10: P-wt-FL_D47 (GSH-gefished) + PSMA7-CT_D46; Spur 11: P-wt-NT_D47 (GSH-gefished) + PSMA7-CT_D46; Spur 12: P-wt-CT_D47 (GSH-gefished) + PSMA7-CT_D46; Spur 13: P-418-FL_D47 (GSH-gefished) + PSMA7-CT_D46; Spur 14: P-418-CT_D47 (GSH-gefished) + PSMA7-CT_D46; Spur 15: Marker

B: Western Blot Membran mit His-Antikörper

Die verschiedenen Parkin-Konstrukte an GSH-Agarosebeads gebunden, dann Zugabe von PSMA7-CT_D46-Lysat. Inkubation über Nacht bei 4°C auf Rollinkubator. Waschen der Beads. Zugabe von 3x SDS-Probenpuffer, 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Probe auf 10-20%iges Criterion™ Tris-HCl-Gradientengel (1x TGS-Laufpuffer) aufgetragen. Elektrophorese: 400 mA, 200 V, 150 W für 1 h. Blotten: 1000 mA, 100 V, 150 W für 1 h.

Beladungsplan: Spur 1: Marker; Spur 2: GSH-Agarosebeads; Spur 3: NiNTA-Sepharosebeads; Spur 4: PSMA7-CT_D46 (Lysat); Spur 5: P-wt-FL_D47 (NiNTA-gefished); Spur 6: P-wt-NT_D47 (NiNTA-gefished); Spur 7: P-wt-CT_D47 (NiNTA-gefished); Spur 8: P-418-FL_D47 (NiNTA-gefished); Spur 9: P-418-CT_D47 (NiNTA-gefished); Spur 10: PSMA7-CT_D46 (NiNTA-gefished) + P-wt-FL_D47; Spur 11: PSMA7-CT_D46 (NiNTA-gefished) + P-wt-NT_D47; Spur 12: PSMA7-CT_D46 (NiNTA-gefished) + P-wt-CT_D47; Spur 13: PSMA7-CT_D46 (NiNTA-gefished) + P-418-FL_D47; Spur 14: PSMA7-CT_D46 (NiNTA-gefished) + P-418-CT_D47; Spur 15: Marker

D46: GATEWAY™ Expressionsvektor pAHLT-D46; besitzt 6x His-Tag

D47: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcG2T-D47; besitzt GST-Tag

5.6 Interaktion von Parkin mit dem natürlichen 26S Proteasom von Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* Sf9

Die Methode der Größenausschluss-Chromatographie wurde auch schon zur Untersuchung von Protein-Komplexen verwendet. Z.B. um zu zeigen, ob sich unter bestimmten Bedingungen mehrere Proteine zu einem aktiven Komplex zusammenlagern oder nicht (K. Cain *et al.*, 1999; K. Cain *et al.*, 2000).

Für die Versuche wurden Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* Sf9 mit rekombinanten Baculoviren beider Interaktionspartner co-infiziert: mit rekombinantem Baculovirus für eines der Parkin-Konstrukte und mit rekombinantem Baculovirus für den Interaktionspartner PSMA7-CT (siehe Tabelle 14)

	Interaktionspartner A	Interaktionspartner B
Wildtyp (Volllängenkonstrukt)	P-wt-FL-D46	PSMA7-CT-D47
Wildtyp (N-terminales Fragment)	P-wt-NT-D46	PSMA7-CT-D47
Wildtyp (C-terminales Fragment)	P-wt-CT-D46	PSMA7-CT-D47
Mutante C416R (Volllängenkonstrukt)	P-418-FL-D46	PSMA7-CT-D47
Mutante C416R (C-terminales Fragment)	P-418-CT-D46	PSMA7-CT-D47

Tabelle 14: Co-Expressionsansätze für die Gelfiltrationsläufe.

D46: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcHLT-D46; besitzt 6x His-Tag

D47: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcG2T-D47; besitzt GST-Tag

Für einen Gelfiltrationslauf wurde das Zellpellet aus 800 mL infizierter *Spodoptera frugiperda* Sf9-Suspensionskultur benötigt.

Von jedem Co-Expressionsansatz wurde vor dem Gelfiltrationslauf anhand eines Western Blots überprüft, ob beide Proteine exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Gelfiltrationssäule und die Fraktionsgröße waren so gewählt, dass sowohl der jeweilige Interaktionskomplex, als auch die jeweils einzelnen, ungebundenen Interaktionspartner in verschiedenen Fraktionen laufen sollten.

Die aus den Gelfiltrationsläufen erhaltenen Fraktionen wurden anhand von Western Blots analysiert.

Bevor mit den Gelfiltrationsläufen begonnen werden konnte, musste die Gelfiltrationssäule HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (Amersham Biosciences GE Healthcare) zuerst mit einer Reihe von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht kalibriert werden (siehe 5.6.1).

5.6.1 Kalibrierung der Gelfiltrationssäule HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR

Die Gelfiltrationssäule wurde anhand ihrer Trennleistung ausgewählt.

Da bei den Versuchen ein Größenbereich von 20 – 100 kDa abgedeckt werden musste, fiel die Wahl auf die Säule „HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR“, die eine Trennleistung für Peptide und Proteine in einem Molekulargewichts-Rahmen von 5 – 250 kDa besitzt.

Der größte mögliche Interaktionskomplex besitzt eine Größe von etwa 98 kDa, das kleinste mögliche Einzelprotein eine Größe von etwa 32 kDa.

Zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule wurden folgende Proteine aus den beiden Kalibrierungs-Kits „Gel Filtration Calibration Kit, High Molecular Weight“ und „Gel Filtration Calibration Kit, Low Molecular Weight“ (von Amersham Biosciences GE Healthcare) verwendet: Blue Dextran (M_r 2 MDa), Katalase (M_r 232 kDa), Albumin (M_r 67 kDa), Ovalbumin (M_r 43 kDa), Chymotrypsinogen A (M_r 25 kDa) und Ribonuklease A (M_r 13,7 kDa).

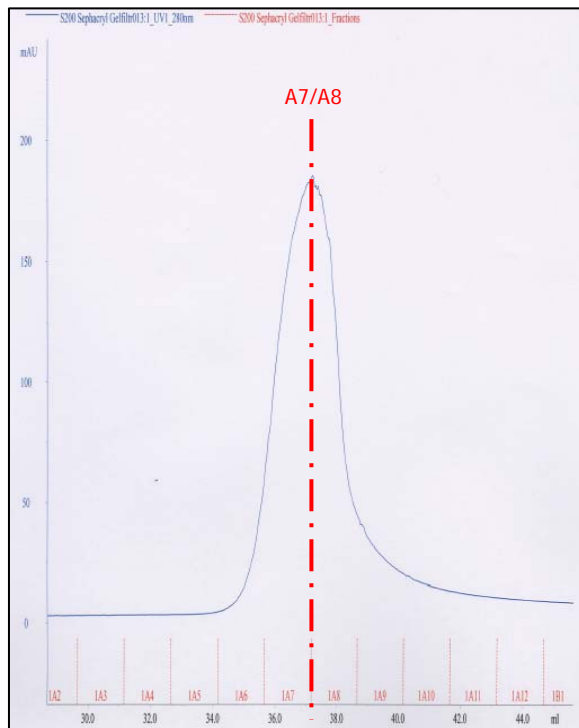
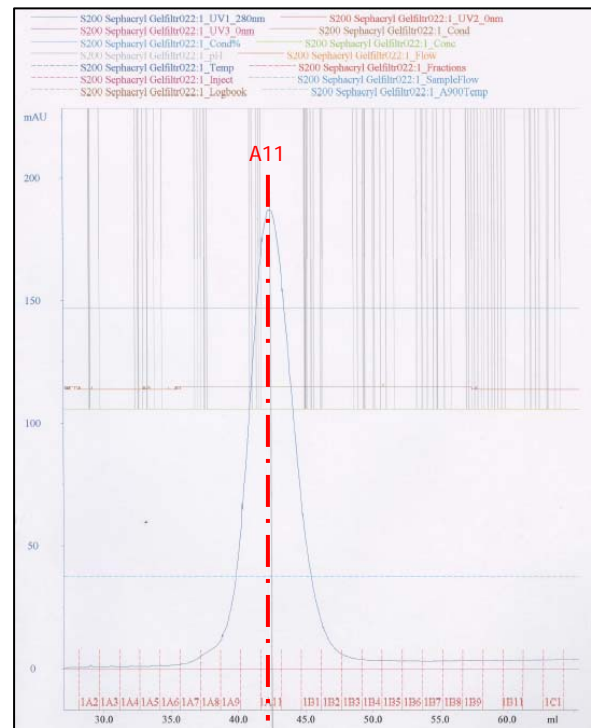
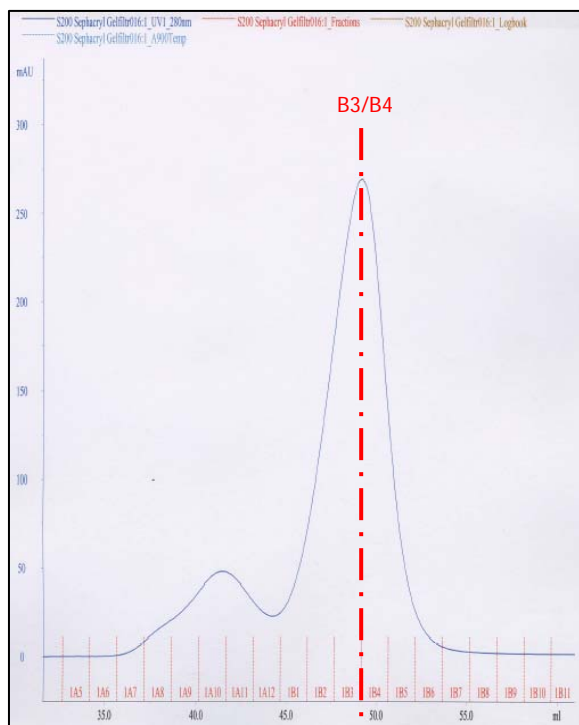
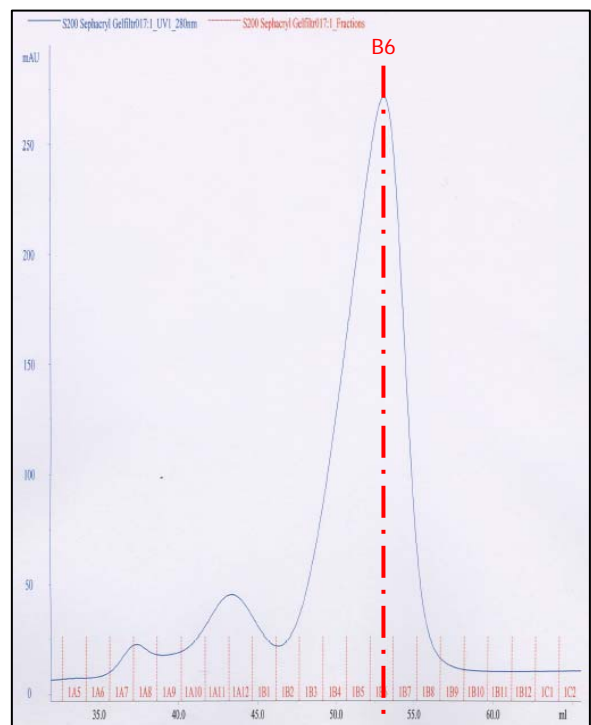
Mit Hilfe der anhand der Kalibrierungsläufe mit diesen Proteinen erhaltenen Daten wurde eine Kalibrierungskurve erstellt (siehe Abbildung 45).

Zur Bestimmung der Kalibrierungsreihe wurde anhand der Gelfiltrationsläufe für jedes der oben genannten Kalibrierungsproteine das Elutionsvolumen V_e bestimmt.

V_e ist das Volumen vom Zeitpunkt der Probenaufgabe auf die Säule an bis zum Zentrum des Elutionspeaks. Diese Volumina können anhand der UV-Chromatogramme (siehe Abbildung 43 und Abbildung 44) für jedes Kalibrierungsprotein abgelesen werden.

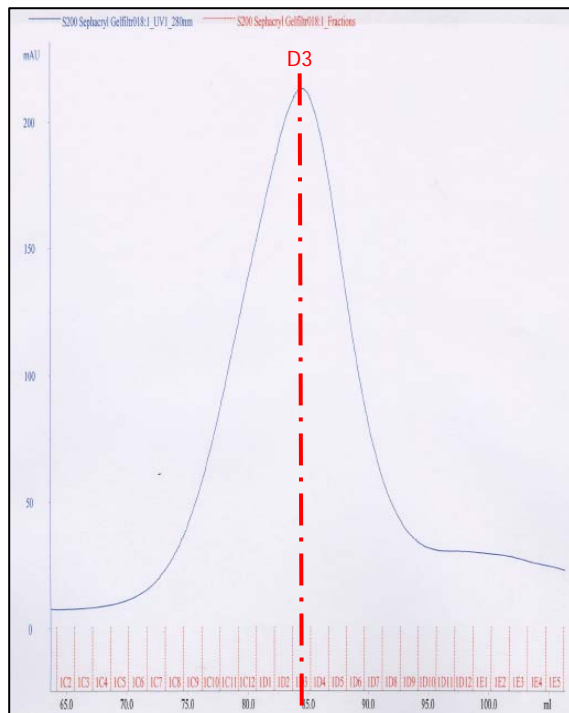
Diese V_e -Werte werden zur Berechnung der sog. K_{av} -Werte, und damit zur Erstellung der Kalibrierungskurve, benötigt.

Anhand der Kalibrierungsläufe und der darauf basierenden Kalibrierungskurve konnte in den anschließenden Gelfiltrationsläufen mit dieser Säule zugeordnet werden, in welchen Fraktionen sich Proteine der entsprechenden Größe befinden.

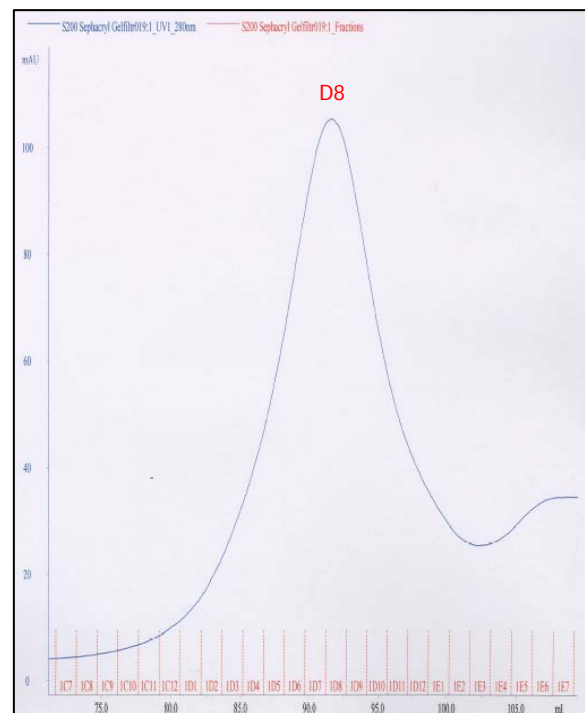
**A:** Blue Dextran 2000 (1 mg/mL)**B:** Katalase (5 mg/mL)**C:** Albumin (7 mg/mL)**D:** Ovalbumin (7 mg/mL)**Abbildung 43: Chromatogramme der einzelnen Kalibrierungsläufe. (1)**

Von jeder Proteinlösung wurden jeweils 2 mL auf die Gelfiltrationsäule HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR gegeben.

— · — · — : Markierung des Zentrums des Elutionspeaks mit Angabe der entsprechenden Fraktion



E: Chymotrypsinogen A (5 mg/mL)



F: Ribonuklease A (10 mg/mL)

Abbildung 44: Chromatogramme der einzelnen Kalibrierungsläufe. (2)

Von jeder Proteinlösung wurden jeweils 2 mL auf die Gelfiltrationsäule HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR gegeben.

— · — : Markierung des Zentrums des Elutionspeaks mit Angabe der entsprechenden Fraktion

Mit Hilfe der anhand der Kalibrierungsläufe der einzelnen Kalibrierungsproteine ermittelten V_e -Werte wurden über die nachstehende Formel die sog. K_{av} -Werte berechnet (siehe Tabelle 15), mit denen anschließend die Kalibrierungskurve (siehe Abbildung 45) erstellt wurde:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V_e : Elutionsvolumen des jeweiligen Kalibrierungsproteins

V_0 : Void Volume der Säule = Elutionsvolumen V_e für Blue Dextran 2 000

V_t : Total Bed Volume der Säule = 120 mL

Protein	Elutions- volumen V_e [mL]	Void Volume der Säule V_0 [mL]	Total Bed Volume der Säule V_t [mL]	K_{av}	Zentrum Elutionspeak in Fraktion
Blue Dextran 2 000	37,2	37,2	120	0	A7/A8
Katalase	42,5	37,2	120	0,064	A11
Albumin	49,1	37,2	120	0,1437	B3/B4
Ovalbumin	53,1	37,2	120	0,1920	B6
Chymotrypsinogen A	84,7	37,2	120	0,5736	D3
Ribonuclease A	91,5	37,2	120	0,6594	D8

Tabelle 15: Anhand der Kalibrierungsläufe erstellte Daten zur Erstellung der Kalibrierungskurve.

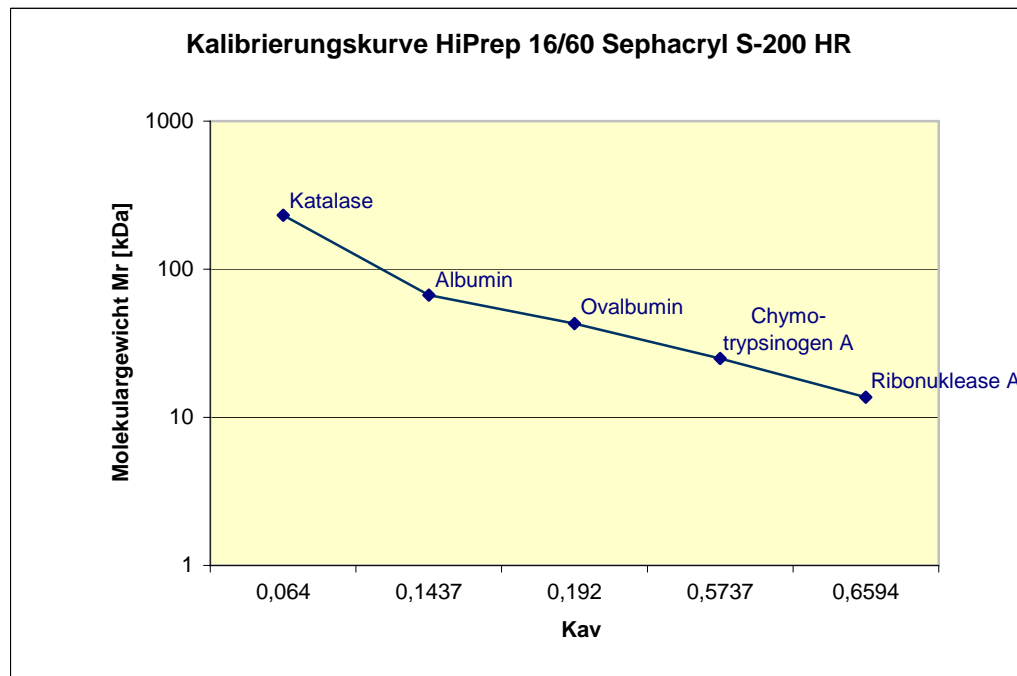


Abbildung 45: Kalibrierungskurve der Gelfiltrationssäule HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR.

Zur Kalibrierung wurde jeweils ein Gelfiltrationslauf mit je 2 mL frisch angesetzter Proteinlösung durchgeführt. Eingesetzte Kalibrierungsproteine: Blue Dextran (M_r 2 MDa; Katalase (M_r 232 kDa); Albumin (M_r 67 kDa); Ovalbumin (M_r 43 kDa); Chymotrypsinogen A (M_r 25 kDa); Ribonuklease A (M_r 13,7 kDa).

5.6.2 Nachweis der Interaktion von Parkin mit alpha4 über die Methode der Gelfiltration nicht möglich

Anhand dieser Methode konnte nicht nachgewiesen bzw. bestätigt werden, ob es zu einer Interaktion zwischen Parkin und der proteasomalen Untereinheit alpha4 kommt. Allen Gelfiltrationsläufen ist gemein, dass beide Proteine zwar in sich überschneidenden Fraktionen gefunden wurden (Ausnahme: Co-Expression des N-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps und alpha4), aber zum einen liefen sie immer deutlich früher von der Säule als erwartet und zum anderen war der Fraktionsbereich, in dem beide Proteine gefunden wurden viel zu groß.

Co-Transfektionsansatz	gemeinsamer Fraktionsbereich	Parkin „alleine“	PSMA7-CT „alleine“
P-wt-FL-D46 + PSMA7-CT-D47	A7 – B12	A6	C1 – C12
P-wt-NT-D46 + PSMA7-CT-D47	-	C10 – D5 und D9 – D10	A7 – B11
P-wt-CT-D46 + PSMA7-CT-D47	A12 – C8	-	A8 – A11 und C9 – D1
P-418-FL-D46 + PSMA7-CT-D47	A7 – B10	-	C4 – C11
P-418-CT-D46 + PSMA7-CT-D47	A10 – B2 und B6 – B9	-	A7 – A9, B3 – B5 und B11 – D1

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Gelfiltrationsläufe.

D46: GATEWAY™ Expressionsvektor pAchLT-D46; besitzt 6x His-Tag

D47: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcG2T-D47; besitzt GST-Tag

Gemeinsamer Fraktionsbereich: Parkin und PSMA7-CT befinden sich in den gleichen Fraktionen

Parkin „alleine“: Parkin in diesen Fraktionen nicht zusammen mit PSMA7-CT zu finden

PSMA7-CT „alleine“: PSMA7-CT in diesen Fraktionen nicht zusammen mit Parkin zu finden

In allen Läufen findet man das exprimierte carboxy-terminale Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT) in den annähernd gleichen Fraktionsbereichen. Dabei wurde jeweils ein zweimaliges Aufkommen des Proteins beobachtet: einmal in den gleichen Fraktionen wie das jeweilige Parkin-Konstrukt, das andere Mal „alleine“ (d.h. nicht zusammen mit dem jeweiligen Parkin-Konstrukt).

Bei dem Gelfiltrationslauf des Co-Expressionsansatzes mit dem Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps (P-wt-FL) findet man das alpha4-Fragment in den Fraktionen A7 – B12 und schwach in den nachfolgenden Fraktionen C1 – C12,

bei dem Gelfiltrationslauf des Co-Expressionsansatzes mit dem carboxy-terminalen Fragment des Parkin-Wildtyps (P-wt-CT) in den Fraktionen A8 – D1.

Bei dem Gelfiltrationslauf des Co-Expressionsansatzes mit dem Volllängenkonstrukt der Parkin-Mutante C418R (P-418-FL) wurde das alpha4-Fragment in den Fraktionen A7 – B10 und in den Fraktionen C4 – C11 detektiert, und bei dem Gelfiltrationslauf des Co-Expressionsansatzes mit dem carboxy-terminalen Fragment der C418R-Mutante (P-418-CT) in den Fraktionen A7 – D1.

Auch bei dem Gelfiltrationslauf des Co-Expressionsansatzes mit dem amino-terminalen Fragment des Parkin-Wildtyps (P-wt-NT) wurde das alpha4-Fragment in dem ersten Fraktionsbereich (A7 – B11) gefunden.

Auch bei den verschiedenen Parkin-Konstrukten gab es Überschneidungen in den Fraktionsbereichen.

Die Konstrukte von Wildtyp und C418R-Mutante der gleichen Größe findet man in den annähernd gleichen Fraktionen. So findet man das Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps (P-wt-FL) in dem gleichen Fraktionsbereich wie das Volllängenkonstrukt der Parkin-Mutante C418R (P-418-FL). Das Wildtyp-Konstrukt wurde in den Fraktionen A6 – B12 nachgewiesen, die Mutante in den Fraktionen A7 – B10. Beide Konstrukte besitzen eine Größe von etwa 53 kDa.

Das carboxy-terminale Fragment des Parkin-Wildtyps (P-wt-CT) und das carboxy-terminale Fragment der Parkin-Mutante C418R (P-418-CT), die beide eine Größe von etwa 32 kDa besitzen, wurden ebenfalls in dem gleichen Fraktionsbereich nachgewiesen. Das Wildtyp-Konstrukt wurde in den Fraktionen A12 – C8 nachgewiesen, die Mutante in den Fraktionen A10 – B2/B6 – B9.

Anmerkung:

Bei vorangegangenen Läufen wurden anfangs alle Fraktionen anhand von Western Blots analysiert. Die Ergebnisse dieser Western Blot-Analysen haben gezeigt und dazu geführt, dass die entsprechenden Fraktionen bei den nachfolgenden Gelfiltrationsläufen nicht aufgrund der Größenangaben aus der Kalibrierungsreihe genommen wurden, sondern aufgrund des verfrühten Auftauchens der Proteine.

5.6.2.1 Gelfiltrationslauf der Co-Expression des Volllängen-Parkin-Wildtyps mit dem carboxy-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4

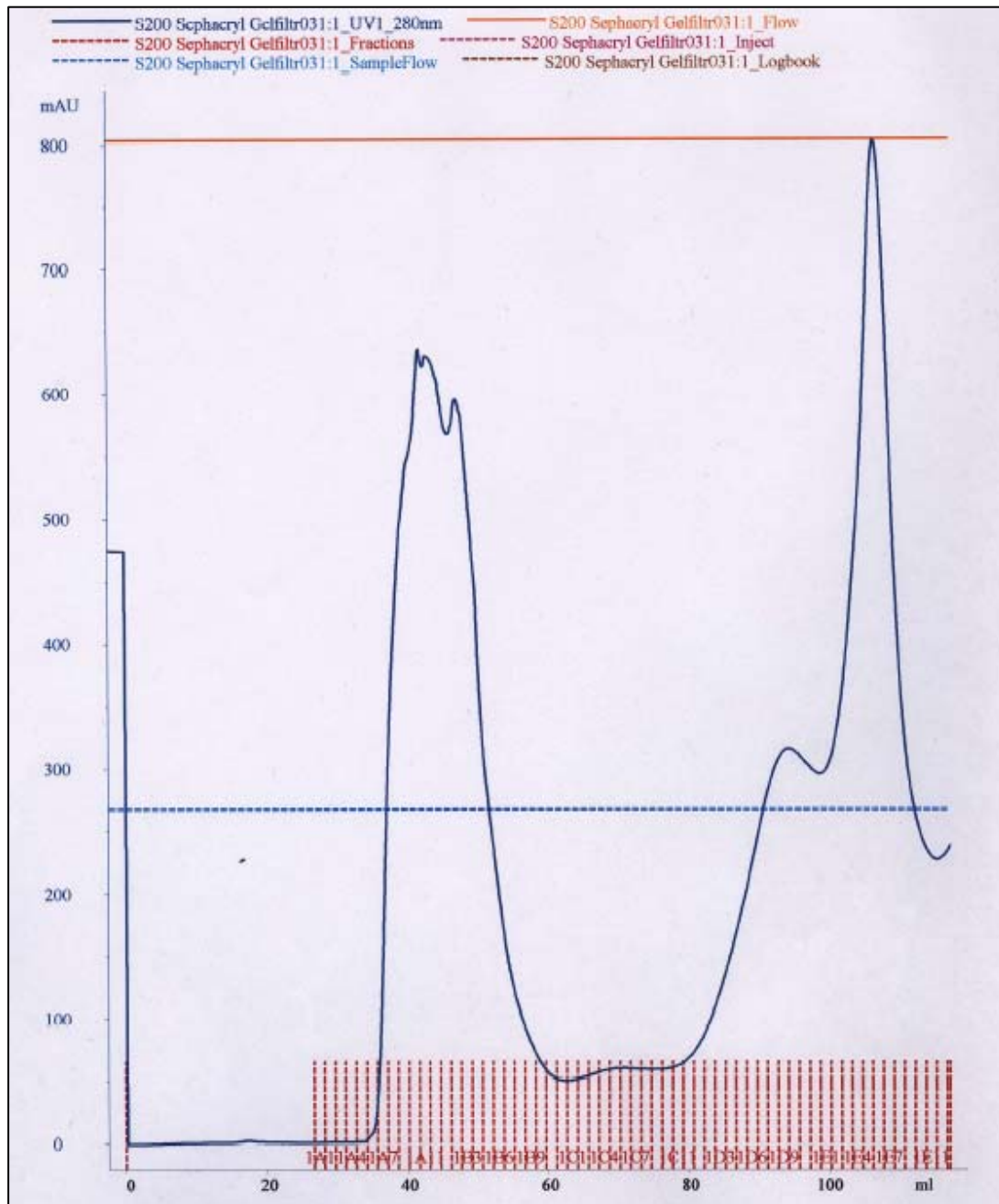


Abbildung 46: Chromatogramm der Co-Expression des Volllängen-Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.

In Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* Sf9 wurden die beiden Proteine P-wt-FL-D46 (Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps) und PSMA7-CT-D47 (C-terminales Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4) co-exprimiert. Aus 800 mL infizierter Sf9-Zellsuspensionskultur wurde das Pellet für den Gelfiltrationslauf gewonnen.

D46: GATEWAY™ Expressionsvektor pAHLT-D46; besitzt 6x His-Tag

D47: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcG2T-D47; besitzt GST-Tag

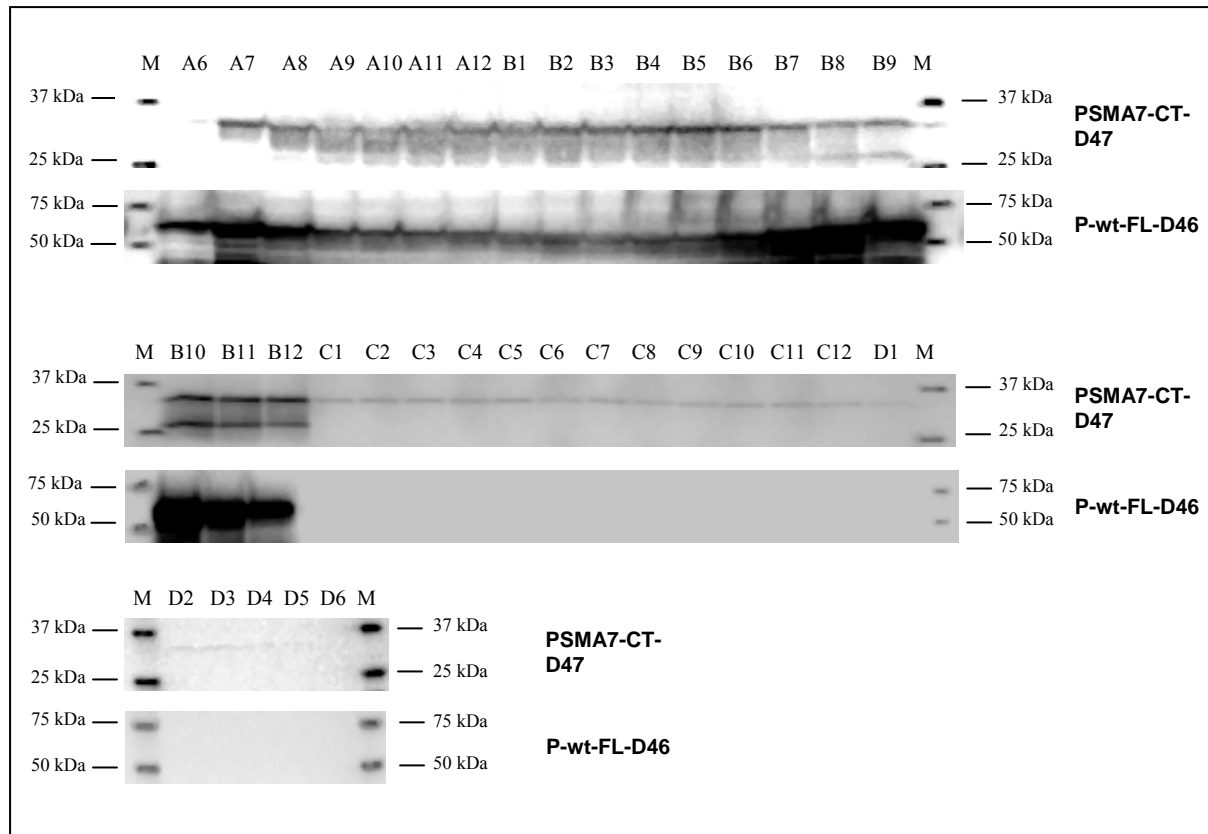


Abbildung 47: Western Blot-Analyse des Gelfiltrationslaufs der Co-Expression des Volllängen-Konstruktes des Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.

Von folgenden Fraktionen jeweils 800 µL als Probe genommen, mit 250 µL 10x SDS-Probenpuffer gemischt und bei 95°C für 5 Minuten aufgeköcht: A6 – D6. Davon je 40 µL auf 10-20 %iges Criterion™ Tris-HCl-Gradientengel (1x TGS-Laufpuffer) aufgetragen. Elektrophorese: 400 mA, 200 V, 150 W für 1 h. Blotten: 1000 mA, 100 V, 150 W für 1 h.

M: Marker

Obwohl man beide Proteine in den gleichen Fraktionen findet, handelt es sich nicht um den Interaktionskomplex, den die beiden Proteine miteinander bilden.

In den Fraktionen C6 – C12 konnte das carboxy-terminale Fragment der alpha4-Untereinheit auch noch schwach nachgewiesen werden.

Zwei Tatsachen sprechen dagegen, dass es sich um den Interaktionskomplex der beiden Proteine handelt:

Zum einen liegen die Maxima der beiden Proteine nicht genau übereinander. Das Maximum des carboxy-terminalen Fragmentes der proteasomalen Untereinheit alpha4 befindet sich in den Fraktionen B10 – B12, das Maximum des Volllängenkonstruktes des Parkin-Wildtyps dagegen befindet sich in den Fraktionen B7 – B9.

Und zum anderen ist der Bereich, in dem beide Proteine zu finden sind, sehr breit. Er erstreckt von Fraktion A7 bis B12, und umfasst damit laut Kalibrierungsreihe einen Größenbereich von etwa 2 MDa – 40 kDa.

5.6.2.2 Gelfiltrationslauf der Co-Expression des amino-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem carboxy-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4

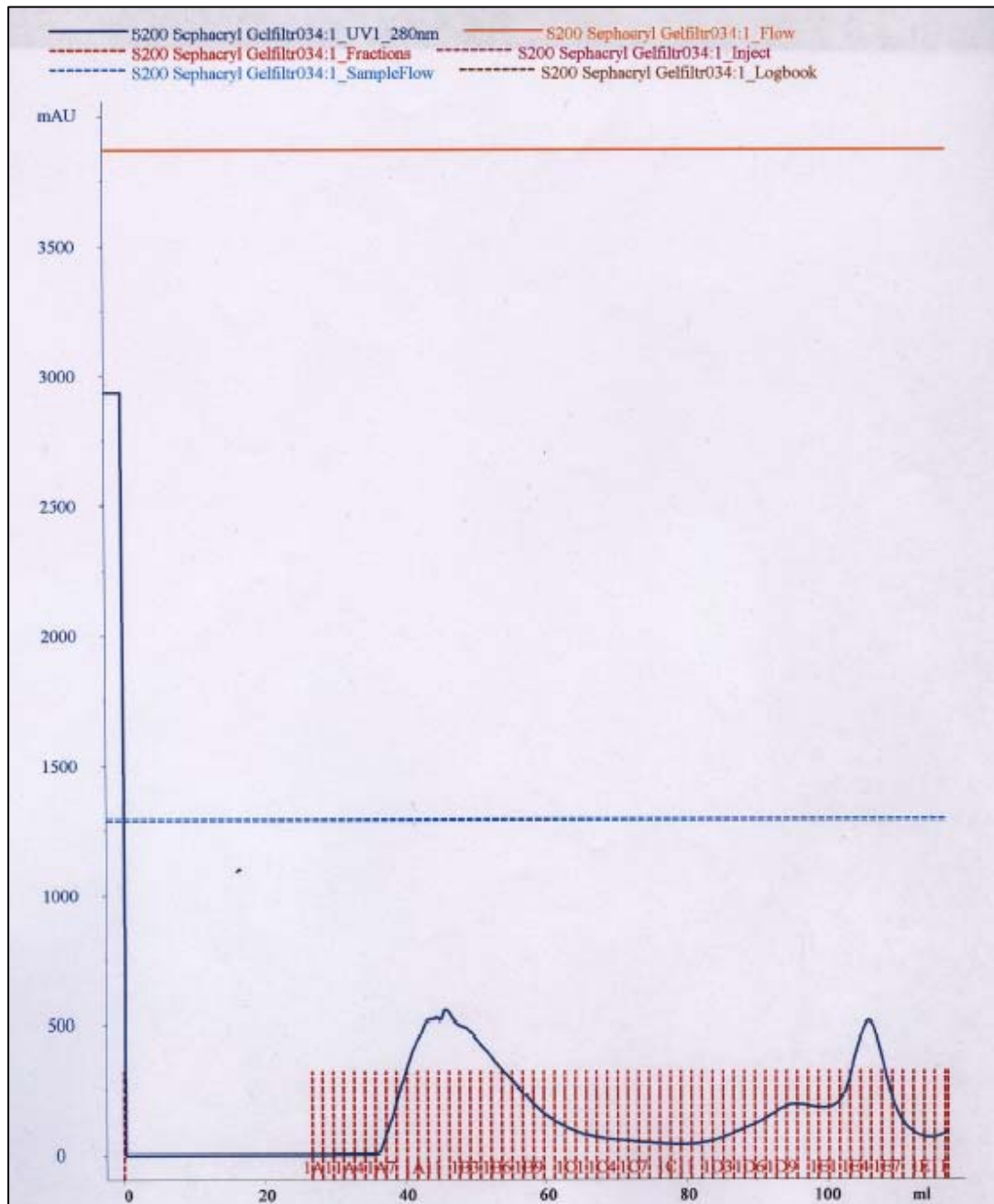


Abbildung 48: Chromatogramm der Co-Expression des N-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.

In Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* Sf9 wurden die beiden Proteine P-wt-NT-D46 (N-terminales Fragment des Parkin-Wildtyps) und PSMA7-CT-D47 (C-terminales Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4) co-exprimiert. Aus 800 mL infizierter Sf9-Zellsuspensionskultur wurde das Pellet für den Gelfiltrationslauf gewonnen.

D46: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcHLT-D46; besitzt 6x His-Tag

D47: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcG2T-D47; besitzt GST-Tag

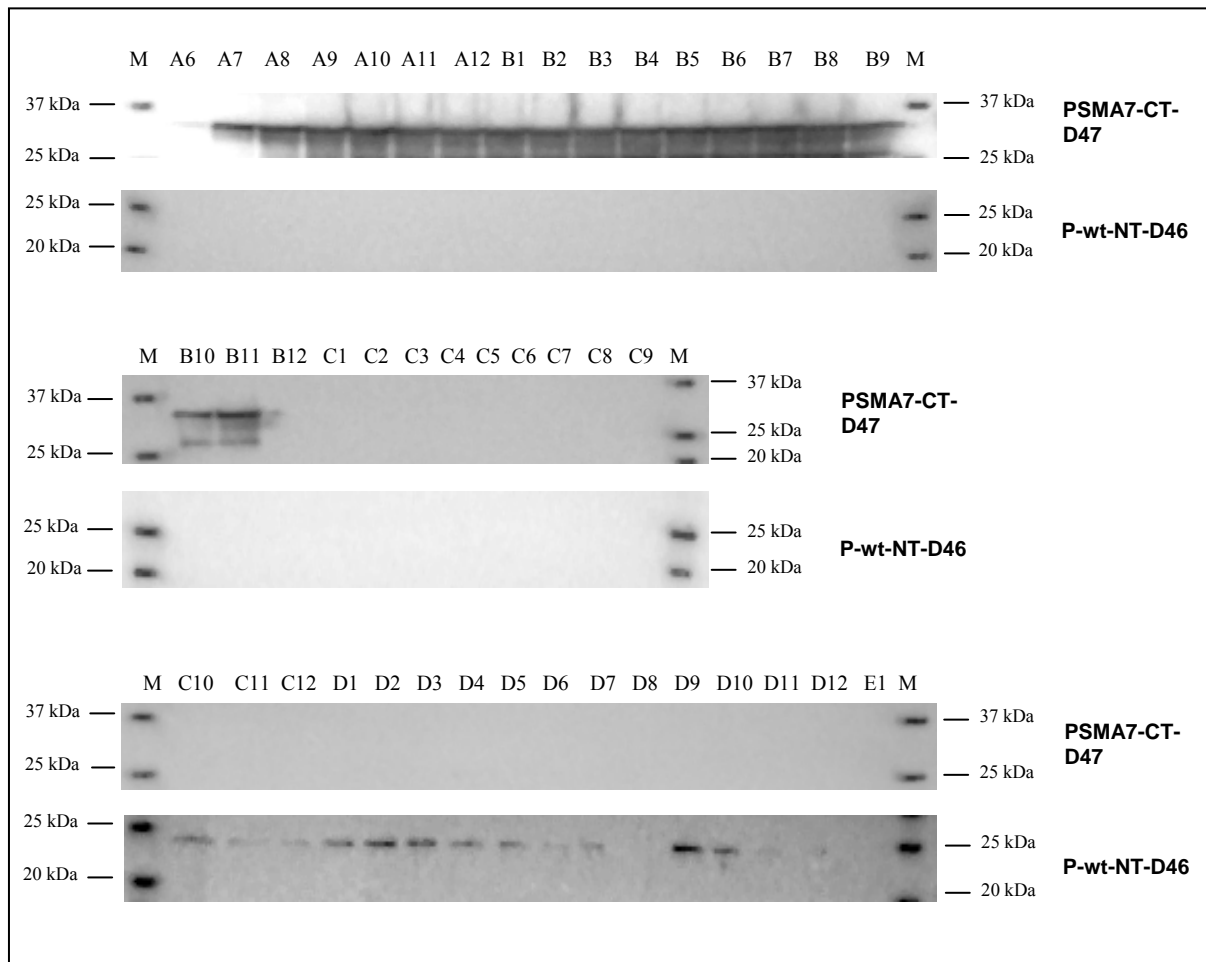


Abbildung 49: Western Blot-Analyse des Gelfiltrationslaufs der Co-Expression des N-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.

Von folgenden Fraktionen jeweils 800 µL als Probe genommen, mit 250 µL 10x SDS-Probenpuffer gemischt und bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht: A6 – E1. Davon je 40 µL auf 10-20 %iges Criterion™ Tris-HCl-Gradientengel (1x TGS-Laufpuffer) aufgetragen. Elektrophorese: 400 mA, 200 V, 150 W für 1 h. Blotten: 1000 mA, 100 V, 150 W für 1 h.

M: Marker

Hier kommt es zu keiner Interaktion zwischen dem carboxy-terminalen Fragment der alpha4-Untereinheit des 26S Proteasoms (PSMA7-CT) und dem amino-terminalen Fragment des Parkin-Wildtyps (P-wt-NT).

Auffällig ist, dass das alpha4-Fragment mit einer Größe von etwa 36 kDa als GST-Fusionsproteinen wesentlich früher von der Säule läuft als erwartet. Wie in dem vorangegangenen Gelfiltrationslauf mit dem Vollängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps findet man das Fragment der proteasomalen Untereinheit in den Fraktionen A7 – B11 und damit auch in einem sehr breiten Fraktionsbereich. Dieser Fraktionsbereich deckt eigentlich einen Größenbereich von etwa 2 MDa bis 40 kDa ab.

Auch das N-terminale Fragment des Parkin-Wildtyps, das als 6x His-Fusionsprotein eine Größe von ca. 23 kDa besitzt, läuft früher von der Säule als erwartet. Man findet das Protein in den Fraktionen C10 – D5 und D9 – D10.

5.6.2.3 Gelfiltrationslauf der Co-Expression des carboxy-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem carboxy-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4

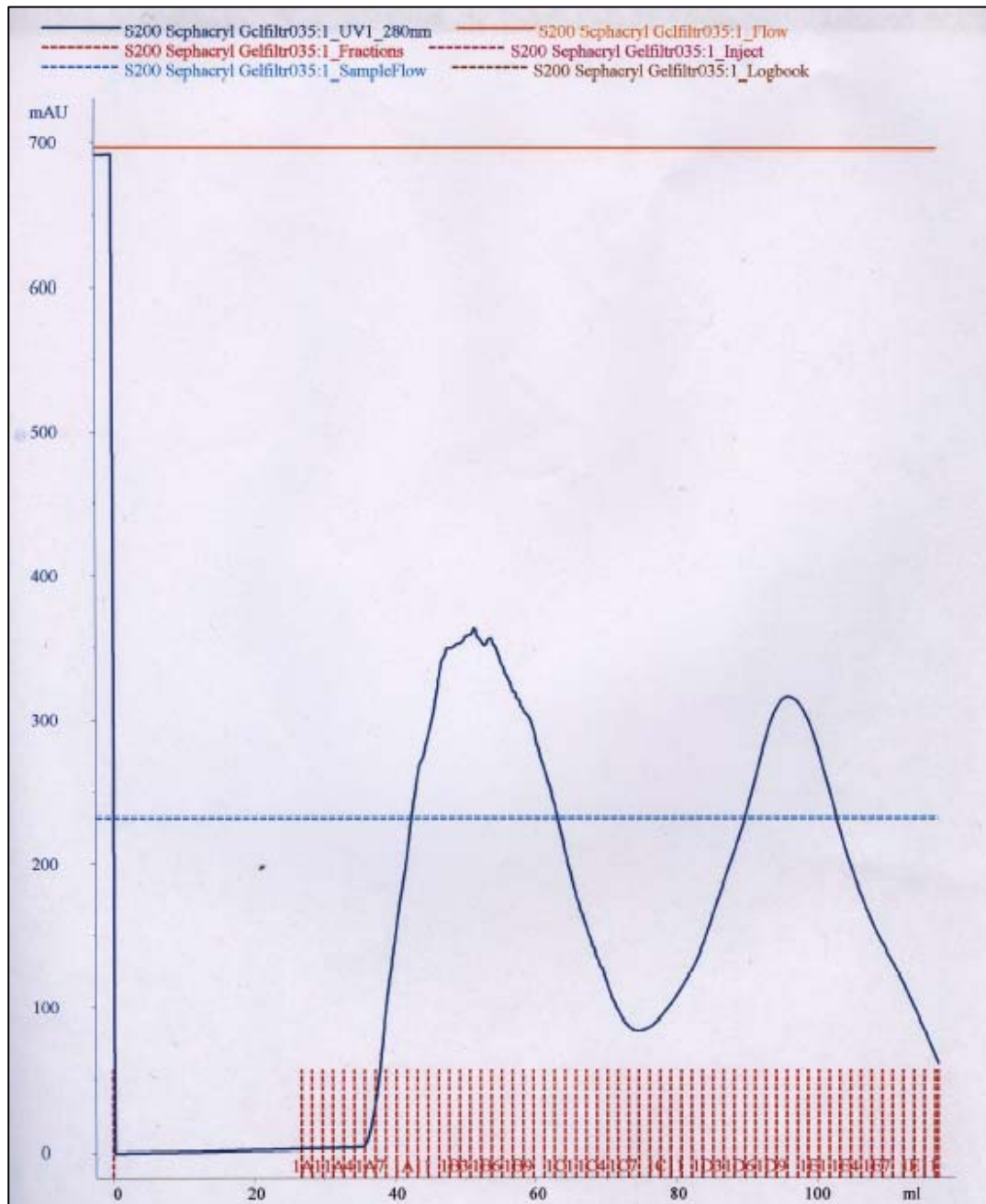


Abbildung 50: Chromatogramm der Co-Expression des C-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.

In Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* Sf9 wurden die beiden Proteine P-wt-CT-D46 (C-terminales Fragment des Parkin-Wildtyps) und PSMA7-CT-D47 (C-terminales Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4) co-exprimiert. Aus 800 mL infizierter Sf9-Zellsuspensionskultur wurde das Pellet für den Gelfiltrationslauf gewonnen.

D46: GATEWAY™ Expressionsvektor pAHLT-D46; besitzt 6x His-Tag

D47: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcG2T-D47; besitzt GST-Tag

Von den entsprechenden Fraktionen wurden jeweils 800 µL mit 250 µL 10x SDS-Puffer versetzt.

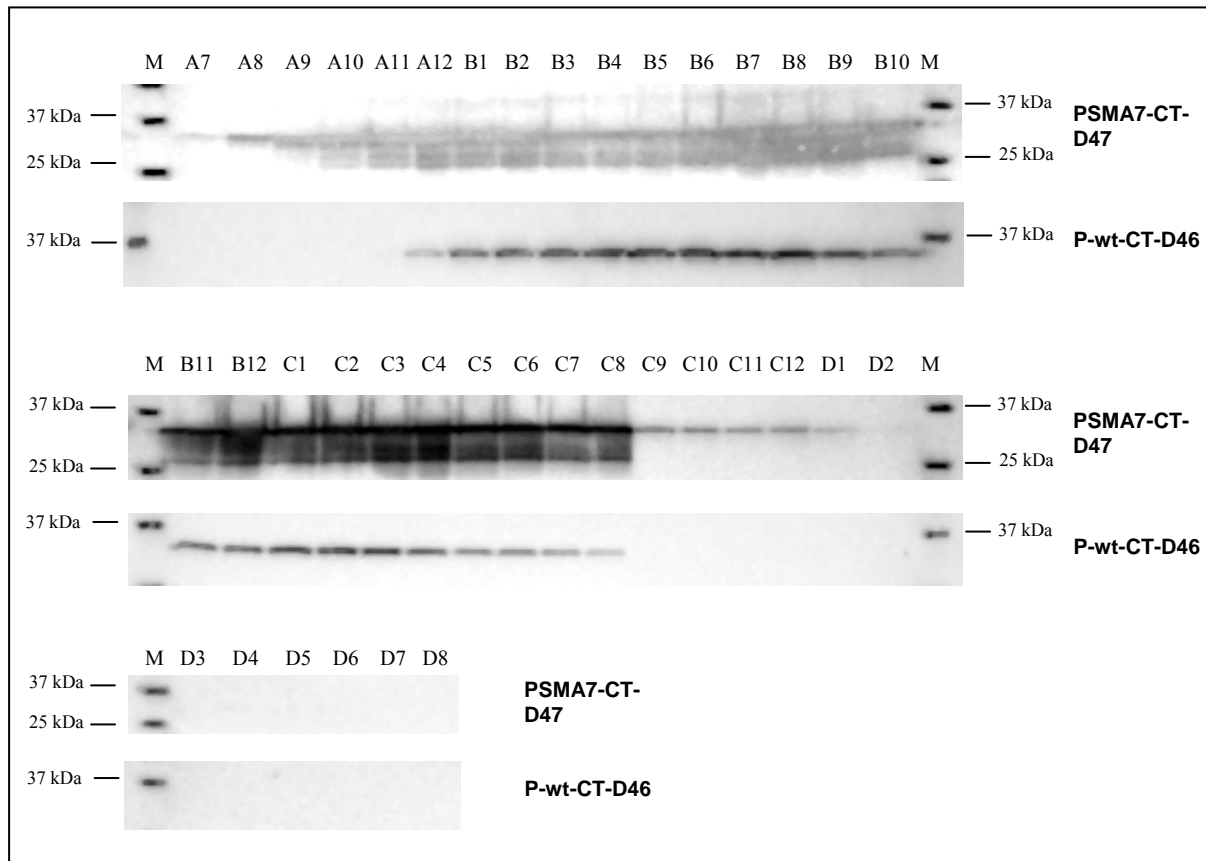


Abbildung 51: Western Blot-Analyse des Gelfiltrationslaufs der Co-Expression des C-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.

Von folgenden Fraktionen jeweils 800 µL als Probe genommen, mit 250 µL 10x SDS-Probenpuffer gemischt und bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht: A7 – D8. Davon je 40 µL auf 10-20 %iges Criterion™ Tris-HCl-Gradientengel (1x TGS-Laufpuffer) aufgetragen. Elektrophorese: 400 mA, 200 V, 150 W für 1 h. Blotten: 1000 mA, 100 V, 150 W für 1 h.

M: Marker

Obwohl man hier beide Proteine in den gleichen Fraktionen findet, handelt es sich nicht um den Interaktionskomplex, den die beiden Proteine miteinander bilden.

In den Fraktionen C9 – D1 wurde das carboxy-terminale Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4 noch schwach detektiert.

Es sind die zwei bereits erwähnten Tatsachen, die gegen einen Interaktionskomplex der beiden Proteine miteinander sprechen:

Die Maxima der beiden Proteine liegen nicht genau übereinander und der Fraktionsbereich in dem beide Proteine zu finden sind ist sehr breit.

Das Maximum des alpha4-Fragmentes (PSMA7-CT) befindet sich in den Fraktionen C4 – C6, das Maximum des carboxy-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps (P-wt-CT) dagegen in den Fraktionen B7 – B8.

Der Fraktionsbereich erstreckt sich von A12 bis C8, was damit laut Kalibrierungsreihe einem Größenbereich von etwa 230 kDa – 35 kDa entspricht.

5.6.2.4 Gelfiltrationslauf der Co-Expression des Volllängen-Konstruktes der Parkin-Mutante C418R mit dem carboxy-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4

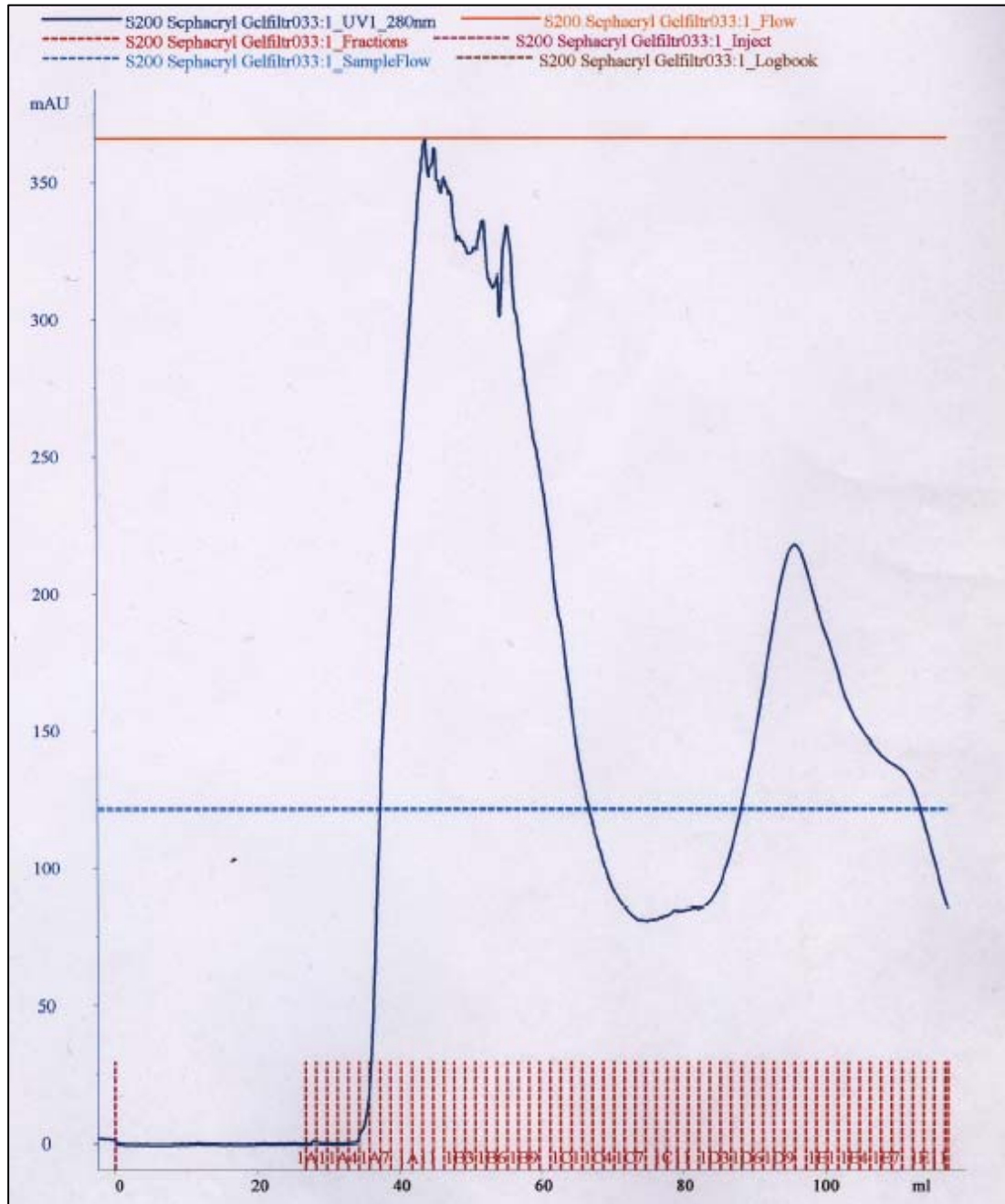


Abbildung 52: Chromatogramm der Co-Expression des Volllängen-Konstruktes der Parkin-Mutante C418R mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.

In Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* Sf9 wurden die beiden Proteine P-418-FL-D46 (Volllängenkonstrukt der Parkin-Mutante C418R) und PSMA7-CT-D47 (C-terminales Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4) co-exprimiert. Aus 800 mL infizierter Sf9-Zellsuspensionskultur wurde das Pellet für den Gelfiltrationslauf gewonnen.

D46: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcHLT-D46; besitzt 6x His-Tag

D47: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcG2T-D47; besitzt GST-Tag

Von den entsprechenden Fraktionen wurden jeweils 800 µL mit 250 µL 10x SDS-Puffer versetzt.

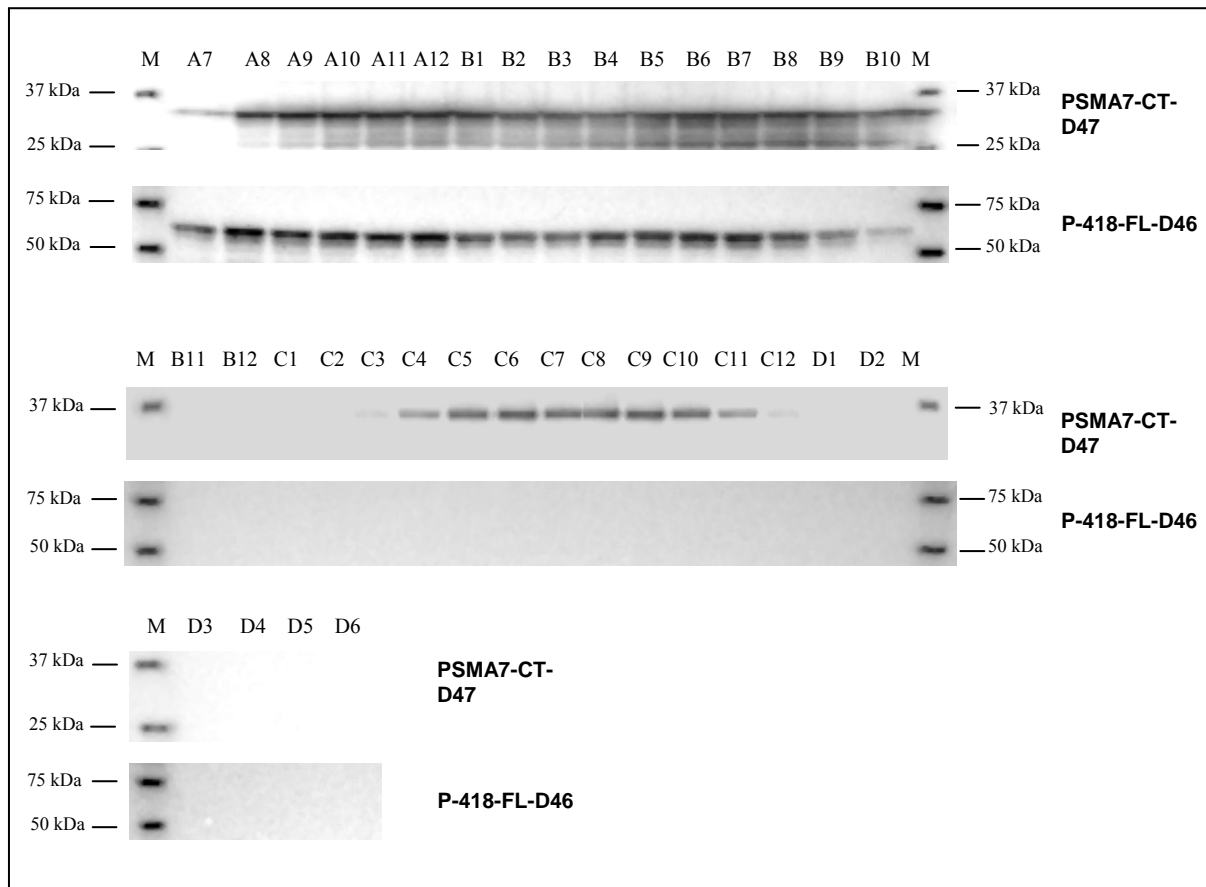


Abbildung 53: Western Blot-Analyse des Gelfiltrationslaufs der Co-Expression des Volllängen-Konstruktes der Parkin-Mutante C418R mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.

Von folgenden Fraktionen jeweils 800 µL als Probe genommen, mit 250 µL 10x SDS-Probenpuffer gemischt und bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht: A7 – D6. Davon je 40 µL auf 10-20 %iges Criterion™ Tris-HCl-Gradientengel (1x TGS-Laufpuffer) aufgetragen. Elektrophorese: 400 mA, 200 V, 150 W für 1 h. Blotten: 1000 mA, 100 V, 150 W für 1 h.

M: Marker

Beide Proteine sind in den gleichen Fraktionen zu finden. Dennoch handelt es sich nicht um den Interaktionskomplex der beiden Proteine.

In den Fraktionen C4 – C11 wurde das carboxy-terminale Fragment der alpha4-Untereinheit (PSMA7-CT) auch noch nachgewiesen.

Folgende Tatsachen sprechen dagegen, dass es sich um den Interaktionskomplex der beiden Proteine handelt:

Die Maxima der beiden Proteine liegen nicht genau übereinander. Das Maximum des alpha4-Fragmentes befindet sich in den Fraktionen A8 – B12. Bei dem Volllängenkonstrukt der Parkin-Mutante C418R (P-418-FL) findet man sogar zwei Maxima, die aber beide nicht mit dem Maximum des alpha4-Fragmentes übereinstimmen: das erste Maximum findet sich in den Fraktionen A8 – A12, das zweite in den Fraktionen B5 – B7.

Zudem ist der Bereich, in dem beide Proteine zu finden sind, sehr breit. Er erstreckt von Fraktion A7 bis B10, und umfasst damit laut Kalibrierungsreihe einen Größenbereich von etwa 2 MDa – 40 kDa.

5.6.2.5 Gelfiltrationslauf der Co-Expression des carboxy-terminalen Fragmentes der Parkin-Mutante C418R mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4

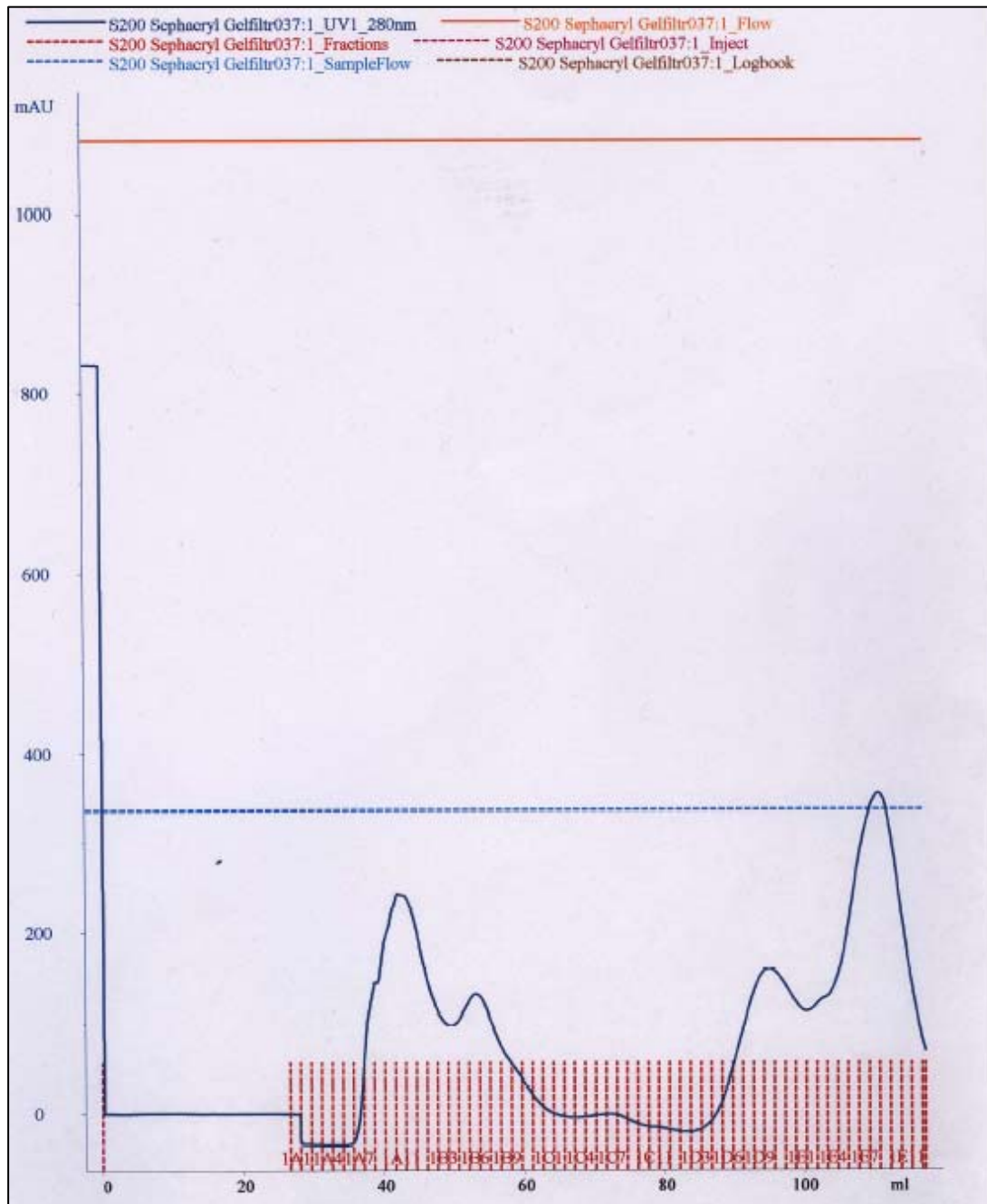


Abbildung 54: Chromatogramm der Co-Expression des C-terminalen Fragmentes der Parkin-Mutante C418R mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.

In Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* Sf9 wurden die beiden Proteine P-418-CT-D46 (C-terminales Fragment der Parkin-Mutante C418R) und PSMA7-CT-D47 (C-terminales Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4) co-exprimiert. Aus 800 mL infizierter Sf9-Zellsuspensionskultur wurde das Pellet für den Gelfiltrationslauf gewonnen.

D46: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcHLT-D46; besitzt 6x His-Tag

D47: GATEWAY™ Expressionsvektor pAcG2T-D47; besitzt GST-Tag

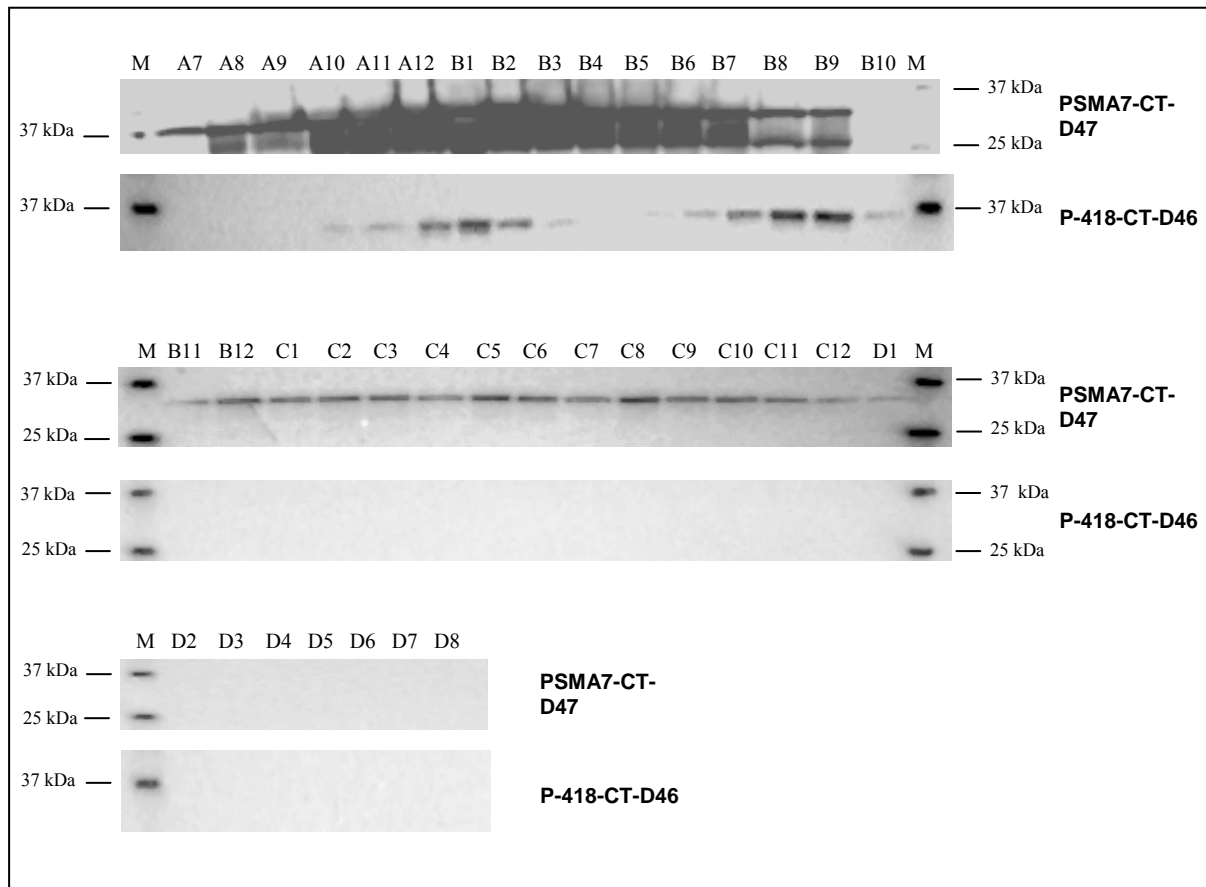


Abbildung 55: Western Blot-Analyse des Gelfiltrationslaufs der Co-Expression des carboxy-terminalen fragmentes der Parkin-Mutante C418R mit dem C-terminalen Fragment der 20S Proteasom-Untereinheit alpha4.

Von folgenden Fraktionen jeweils 800 µL als Probe genommen, mit 250 µL 10x SDS-Probenpuffer gemischt und bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht: A7 – D8. Davon je 40 µL auf 10-20 %iges Criterion™ Tris-HCl-Gradientengel (1x TGS-Laufpuffer) aufgetragen. Elektrophorese: 400 mA, 200 V, 150 W für 1 h. Blotten: 1000 mA, 100 V, 150 W für 1 h.

M: Marker

Obwohl beide Proteine in den gleichen Fraktionen zu finden sind, handelt es sich nicht um den Interaktionskomplex, den die beiden Proteine miteinander bilden.

Auch in den Fraktionen B11 bis D1 wurde das carboxy-terminale Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT) nachgewiesen.

Die beiden Tatsachen, dass die Maxima der beiden Proteine nicht genau übereinander liegen und der sehr breite Fraktionsbereich, sprechen dagegen, dass es sich trotz überlappender Fraktionen um den Interaktionskomplex der beiden Proteine handelt.

Das Maximum des alpha4-Fragmentes als GST-Fusionsprotein (PSMA7-CT_D47) befindet sich in den Fraktionen A12 – B3, das Maximum des carboxy-terminalen Fragmentes der Parkin-Mutante C418R (P-418-CT) dagegen in den Fraktionen B8 – B9.

Und der Bereich, in dem beide Proteine zu finden sind, erstreckt von Fraktion A11 bis B9, und umfasst damit laut Kalibrierungsreihe einen Größenbereich von etwa 230 kDa – 40 kDa.

5.7 Co-Lokalisation von Parkin und alpha4 in HeLa-Zellen

Zusätzlich zum Nachweis der Interaktion auf Proteinebene mit Lysaten und gereinigten Proteinen, sollte auch die (Co-)Lokalisation der beiden Proteine in HeLa-Zellen gezeigt werden.

Die Technik der Immunfluoreszenz ermöglicht die Visualisierung der Verteilung und Lokalisierung spezifischer zellulärer Komponenten innerhalb einer Zelle.

Bevor die Versuche zur Untersuchung der (Co-)Lokalisationen von Parkin und der 26S proteasomalen Untereinheit alpha4 durchgeführt wurden, wurde in einem Vorversuch überprüft, ob die exprimierten Fremdproteine für die HeLa-Zellen toxisch sind und ob sie löslich sind (siehe 5.7.1).

Auch konnte anhand dieses Vorversuches getestet werden, ob das Transfektionsprotokoll (z.B. bzgl. Transfektionsdauer) optimiert werden musste.

Für diesen Vorversuch wurden Einfach-Transfektionen mit den sieben verschiedenen Konstrukten des Parkin-Wildtyps und dem carboxy-terminalen Fragment für die proteasomale Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT) durchgeführt (siehe 5.7.1).

Die Parkin-Konstrukte waren in einen GATEWAYTM-Expressionsvektor kloniert, der einen CFP-Tag besitzt (pdECFP-D11), der Interaktionspartner PSMA7-CT in den GATEWAYTM-Expressionsvektor pdEYFP-D12 mit YFP-Tag.

HeLa-Zellen wurden in sog. *Life Cell Dishes* (MatTek Co) ausgesät und bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte bzw. mit dem PSMA7-CT-Konstrukt transfiziert. 22h nach der Transfektion wurden die Präparate unter dem Mikroskop angeschaut. Die exprimierten Fusionsproteine wurden nicht über Antikörper-Markierung (indirekte Immunfluoreszenz) nachgewiesen, sondern konnten durch Anregung ihres Fluoreszenztags mit Licht entsprechender Wellenlänge direkt über dessen Lichtemission sichtbar gemacht werden (direkte Fluoreszenz). Dabei wurde CFP mit Licht der Wellenlänge 452 nm angeregt (Lichtemission dann bei überwiegend 504 nm) und YFP mit Licht der Wellenlänge 514 nm (Lichtemission bei überwiegend 527 nm).

5.7.1 Test auf Löslichkeit der einzeln exprimierten Interaktionspartner Parkin und alpha4 in HeLa-Zellen

Der Versuch zeigt, dass die exprimierten Parkin-Proteine prinzipiell löslich und für die HeLa-Zellen nicht toxisch waren.

Lediglich bei dem Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps (P-wt-FL) ist eine starke Aggregat-Bildung zu beobachten, während bei dem amino-terminalen Fragment (P-wt-NT) und dem carboxy-terminalen Fragment (P-wt-CT) des Wildtyps nur vereinzelt Aggregate zu erkennen sind. Bei zu starker Expression versucht die Zelle den Proteinüberschuss, den das exprimierte Fremdprotein (Parkin) darstellt, durch Aggregatbildung zu entfernen.

Bei dem Konstrukt für die Ring 1-Domäne (TF_F220-R318), dem Konstrukt für die *In-Between-Ring-Region* (TF_F304-R404) und dem Konstrukt für die Ring 2-Domäne (TF_F395-R465) findet keine Aggregat-Bildung statt.

Bei dem Volllängenkonstrukt (P-wt-FL), dem amino-terminalen Fragment (P-wt-NT) des Wildtyps und dem Wildtyp-Konstrukt, das die *Ubiquitin-like*-Domäne mit der Ring 1-Domäne darstellt (TF_F2-R318), kommt es zur Bildung von Aggresomen, die sich an das Centrosom anlagern. (Aggresomen durch rote Pfeile markiert.)

Das Centrosom liegt in der Interphase auf der Seite des Zellkerns, über der Außenfläche der Kernhülle.

Bei Aggresomen handelt es sich um zytoplasmatische Einschlusskörper (M. M. K. Muqit *et al.*, 2003), die das aggregierte Fremdprotein (hier: CFP-getaggtetes Parkin) enthalten.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Aggresomen die Verteilung der Intermediärfilamente im Zytoplasma verändern. So ist um Aggresomen herum Vimentin, ein Filamentprotein des Zytoskeletts, stellenweise kollabiert (M. M. K. Muqit *et al.*; 2003).

Zur Überprüfung des vermeintlichen Einflusses der Aggresomen auf Verteilung der Intermediärfilamente wurde eine Immunfärbung mit einem Antikörper gegen Vimentin durchgeführt (siehe 5.7.2.1).

Zudem wurde noch untersucht, ob die Anlagerung des Aggresoms an das Centrosom auch die Lage des Golgi-Apparates verändert. Aus der Literatur ist bekannt, dass es Interaktionen zwischen dem Golgi-Apparat und Mikrotubuli gibt. Aggregat-Bildung hat einen Transport dieser Aggregate entlang von Mikrotubuli-Bahnen zu den Aggresomen zur Folge. Dies lies die Hypothese aufkommen, dass durch diesen Transport vielleicht auch die Lage des Golgi-Apparates verändert wird. Der Golgi-Apparat liegt gewöhnlich in der Nähe des Zellkerns, und ist oft auch um das Centrosom lokalisiert (R. R. Kopito, 2000).

Dazu wurde eine Immunfärbung mit einem Golgi-Marker durchgeführt (siehe 5.7.2.2)

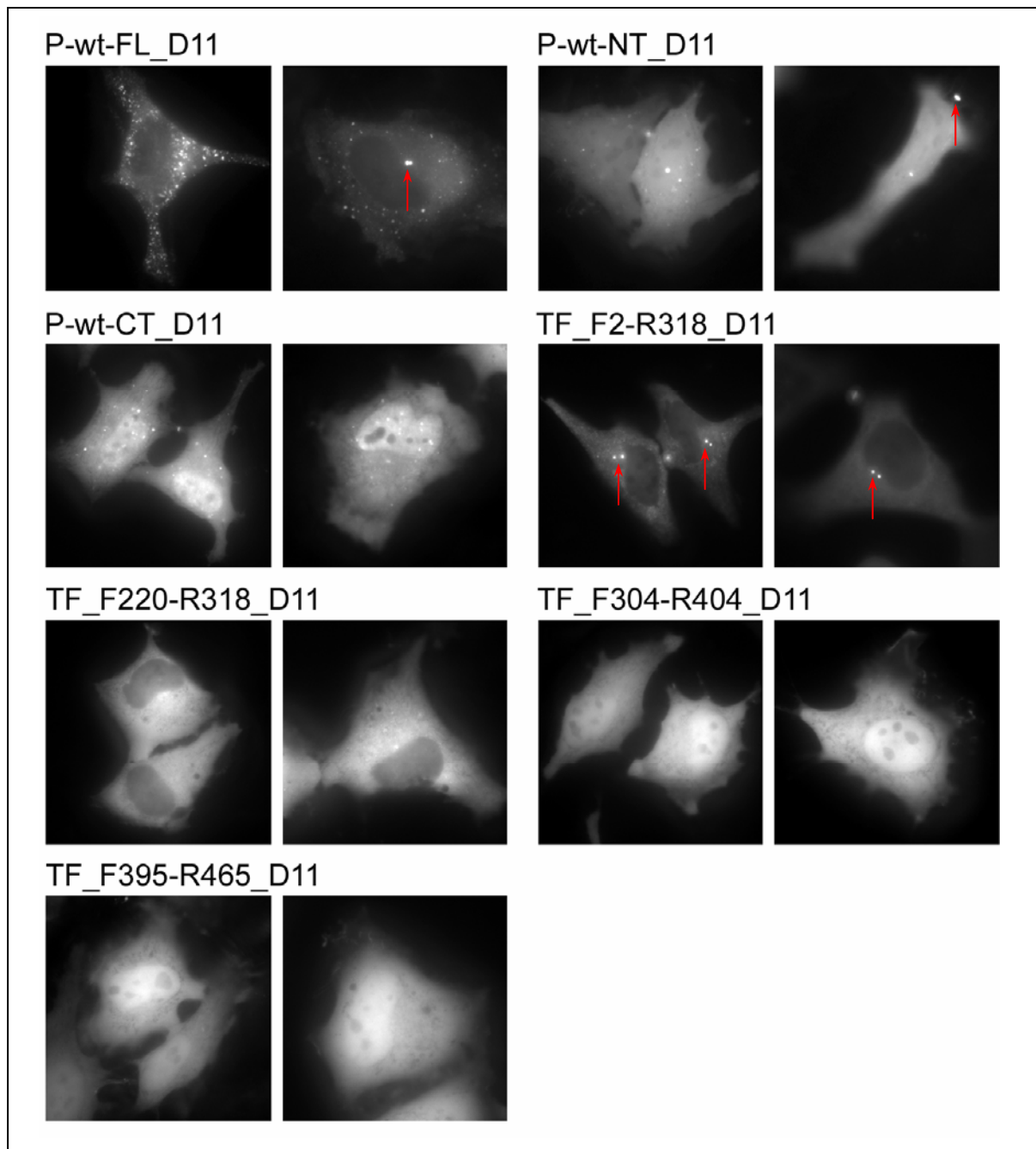


Abbildung 56: Lokalisation von Parkin in der Zelle.

Einfach-Transfektionen mit den verschiedenen Parkin-Wildtyp-Konstrukten.

HeLa-Zellen in *Life Cell Dishes* ausgesät und bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukten transfiziert. Die Konstrukte befanden sich in dem GATEWAYTM-Expressionsvektor pdECFP-D11. 22 h nach der Transfektion Präparate mikroskopisch angeschaut.

Lokalisierung der Parkin-Proteine durch die Fluoreszenz ihres CFP-Tags.

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAYTM-Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

→ : Aggresomen an den Centrosomen

Das carboxy-terminale Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT) konnte nur im Zellkern, nicht aber im Zytoplasma nachgewiesen werden.

Proteasomen findet man aber normalerweise sowohl im Zytosol, als auch im Nukleus eukaryontischer Zellen (M. Bochtler *et al.*, 1999).

Da PSMA7-CT als YFP-Fusionsprotein ausschließlich im Kern lokalisiert wurde, und nicht im Zytoplasma, wurde für die nachfolgenden Co-Lokalisationsstudien das PSMA7-CT-Fragment in einen Vektor mit einem anderen Tag kloniert (siehe 5.7.4), da angenommen wurde, dass durch den Tag eine Signalstelle für den entsprechenden Transportfaktor blockiert wurde. Als Alternative wurde der Vektor pCMV-Myc ausgewählt.

(Klonierung PSMA7-CT in Vektor pCMV-Myc: siehe 5.3.)

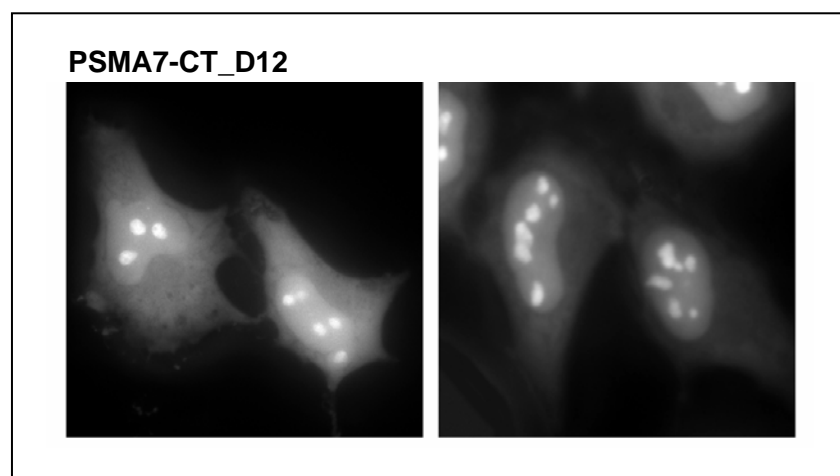


Abbildung 57: Lokalisation des carboxy-terminalen alpha4-Fragmentes des 26S Proteasoms in der Zelle.

Einfach-Transfektion mit dem PSMA7-CT-Fragment.

HeLa-Zellen in *Life Cell Dishes* ausgesät und bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit dem PSMA7-CT-Fragment transfiziert. Das Fragment befand sich in dem GATEWAYTM-Expressionsvektor pdEYFP-D12. 22 h nach der Transfektion wurde das Präparat mikroskopisch angeschaut.

Lokalisierung des PSMA7-CT-Proteins durch die Fluoreszenz seines YFP-Tags.

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D12: GATEWAYTM-Expressionsvektor pdEYFP-D12; besitzt YFP-Tag

5.7.2 Einfluss der Aggresomen auf die Intermediärfilamente und Lokalisation des Golgi-Apparates

Zur Untersuchung des vermeintlichen Einflusses einer Aggresomen-Anlagerung an den Centrosomen auf die Verteilung der Intermediärfilamente wurde Vimentin über eine Immunfärbung sichtbar gemacht (siehe 5.7.2.1).

Vimentin ist ein Filamentprotein des Zytoskeletts. Laut Literaturangabe ist Vimentin um Aggresomen herum stellenweise kollabiert (M. M. K. Muqit *et al.*; 2003).

Zur Überprüfung, ob der Golgi-Vesikel durch die Anlagerung von Aggresomen an die Centrosomen verlagert wird, wurde eine Immunfärbung mit dem Golgi-Marker GM130 durchgeführt (siehe 5.7.2.2).

5.7.2.1 Einfluss der Aggresomen auf die Verteilung der Intermediärfilamente

Aggresomen sind zytoplasmatische Einschlusskörper. Zur Aggresom-Bildung kommt es, wenn Protein-Aggregate, die sich in der Zellperipherie gebildet haben entlang von Mikrotubuli-Bahnen zu den Centrosomen gebracht werden (R. R. Kopito, 2000). Durch diesen Transport entlang von Mikrotubuli-Bahnen innerhalb des Zytoplasmas kann es zum Kollabieren der Intermediärfilamente kommen.

Für diese Untersuchung wurden HeLa-Zellen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten transfiziert.

Die exprimierten Parkin-Proteine in transfizierten Zellen wurden anhand ihres fluoreszierenden CFP-Tags in der Zelle lokalisiert, der Nachweis von Vimentin erfolgte durch eine Immunfärbung mit einem Vimentin-Antikörper.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Präparate wurde die Verteilung von Vimentin in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen miteinander verglichen.

Der vermeintliche Effekt, dass eine Aggresomen-Bildung an den Centrosomen eine Veränderung der Verteilung von Vimentin verursacht, hat sich nicht bestätigt.

Lediglich bei zwei Konstrukten wurde eine Veränderung der Vimentin-Verteilung beobachtet: bei dem amino-terminale Fragment des Parkin-Wildtyps (P-wt-NT) und dem carboxy-terminalen Fragment der Parkin-Mutante C289G (P-289-CT). Bei diesen zwei Konstrukten ist deutlich zu erkennen, dass in transfizierten Zellen Vimentin nur um den Kern herum lokalisiert ist, während in nicht transfizierten Zellen Vimentin sich im gesamten Zytoplasma verteilt.

(siehe Abbildung 58 und Abbildung 59)

Parkin ist prinzipiell löslich und nicht toxisch für die Zellen.

Durch die Expression des Fremdproteins kommt es bei folgenden Konstrukten zur Aggregat-Bildung: dem Volllängenkonstrukt (P-wt-FL) und dem amino-terminalen Fragment (P-wt-NT) des Wildtyps, dem carboxy-terminalen Fragment der Parkin-Mutante C289G (P-289-CT), dem Volllängenkonstrukt der Parkin-Mutante C418R sowie den beiden Wildtyp-Konstrukten TF_F2-R318 (= *Ubiquitin-like*-Domäne und Ring 1-Domäne) und TF_F395-R465 (= *In-Between-Ring*-Region).

(siehe Abbildung 58 und Abbildung 59)

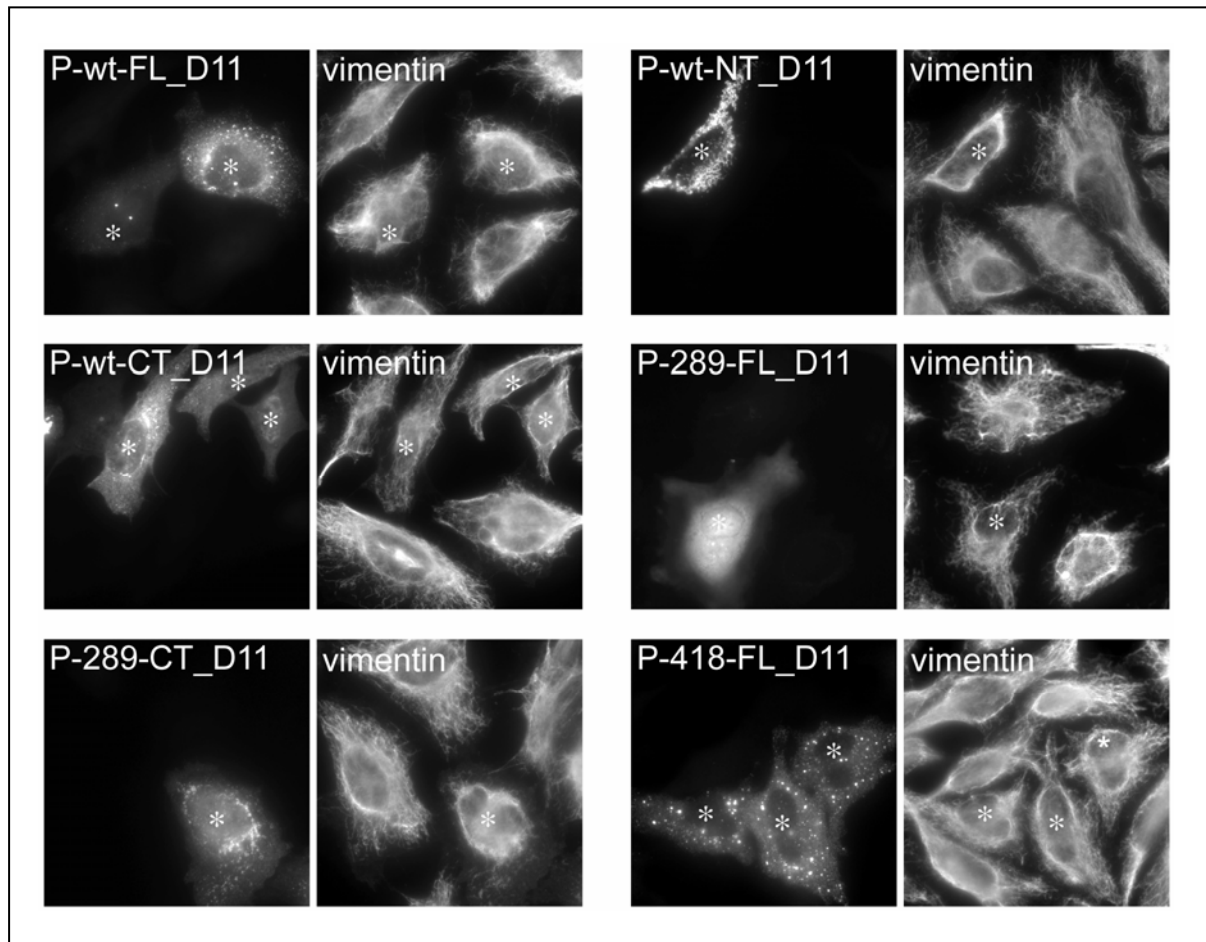


Abbildung 58: Lokalisation von Parkin und Verteilung von Vimentin in der Zelle. (1)

Einfach-Transfektionen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten.

HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, in denen sich jeweils ein Deckgläschen befand. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte transfiziert. Die Fragmente befanden sich in dem GATEWAY™-Expressionsvektor pdECFP-D11. 22 h nach der Transfektion erfolgte ein Primär-Antikörper-*Staining* gegen Vimentin. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor®568 eingesetzt. Die exprimierten Parkin-Proteine wurden über die Fluoreszenz ihres CFP-Tags lokalisiert.

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAY™ Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

*: Markierung transfizierter Zellen

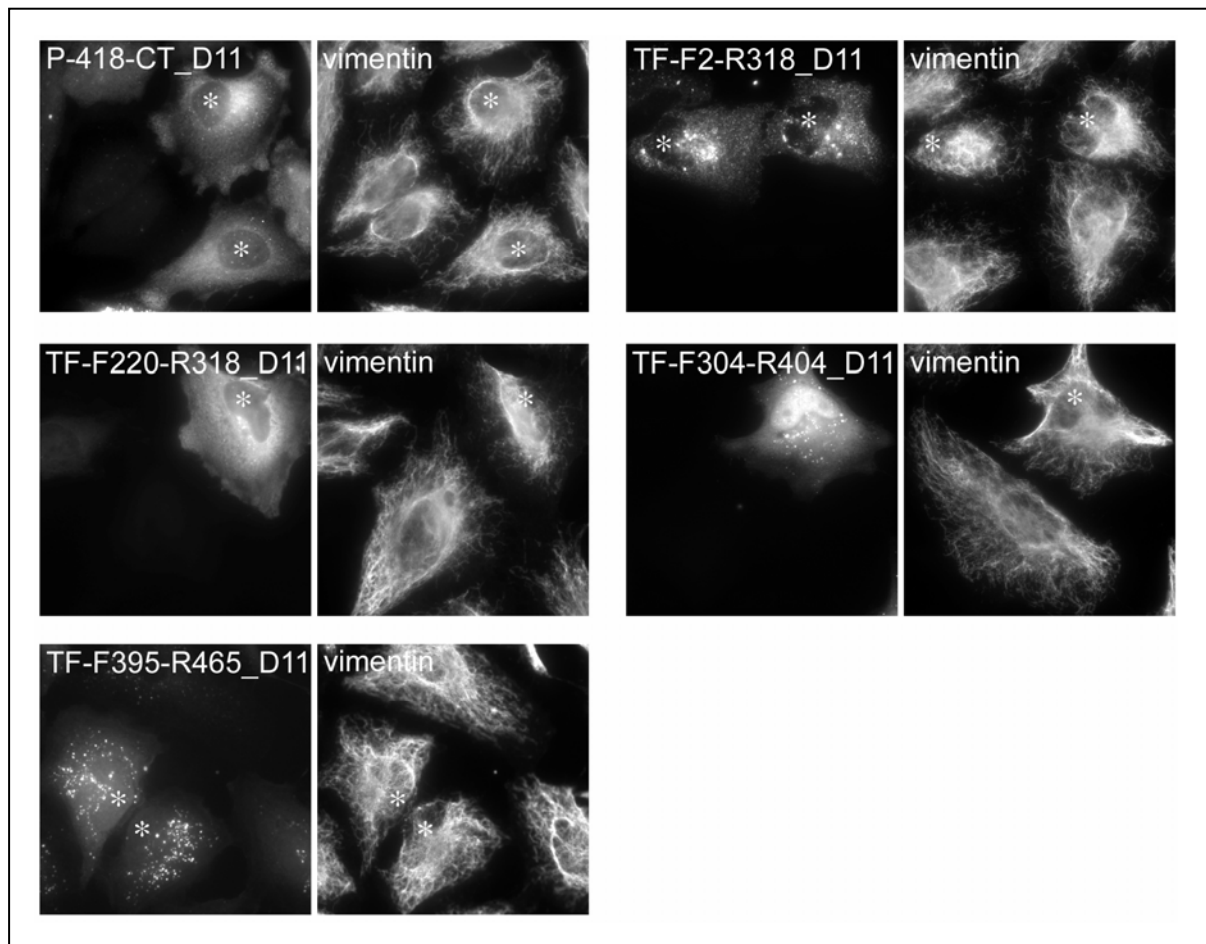


Abbildung 59: Lokalisation von Parkin und Verteilung von Vimentin in der Zelle. (2)

Einfach-Transfektionen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten.

HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, in denen sich jeweils ein Deckgläschen befand. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte transfiziert. Die Fragmente befanden sich in dem GATEWAY™-Expressionsvektor pdECFP-D11. 22 h nach der Transfektion erfolgte ein Primär-Antikörper-*Staining* gegen Vimentin. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor® 568 eingesetzt. Die exprimierten Parkin-Proteine wurden über die Fluoreszenz ihres CFP-Tags lokalisiert.

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAY™ Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

*: Markierung transfizierter Zellen

5.7.2.2 Einfluss der Aggresomen auf die Lage des Golgi-Apparates

Anhand dieser Versuche sollte untersucht werden, ob sich die Lage des Golgi-Apparates durch die Anlagerung von Aggresomen an die Centrosomen verändert.

Der Golgi-Apparat ist normalerweise am Zellkern, um das Centrosom lokalisiert (R. R. Kopito, 2000).

Für diese Untersuchung wurden HeLa-Zellen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten transfiziert.

Die exprimierten Parkin-Proteine in transfizierten Zellen wurden anhand ihres fluoreszierenden CFP-Tags in der Zelle lokalisiert. Der Golgi-Apparat wurde über eine Immunfärbung mit einem GM130-Antikörper nachgewiesen.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Präparate wurde die Lage des Golgi-Apparates in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen miteinander verglichen.

Bei keinem der untersuchten Präparate konnte ein Unterschied in der Lokalisation des Golgi-Apparates beim Vergleich von transfizierten mit nicht-transfizierten HeLa-Zellen beobachtet werden: der Golgi-Apparat befand sich immer nahe dem Zellkern und damit an seiner typischen Stelle.

Die Lage des Golgi-Apparates wird durch die Anlagerung von Aggresomen an das Centrosom also nicht verändert.

(siehe Abbildung 60 und Abbildung 61)

Parkin ist prinzipiell löslich und nicht toxisch für die Zellen.

Durch die Expression des Fremdproteins kommt es bei folgenden Konstrukten zur Aggregat-Bildung: dem Volllängenkonstrukt (P-wt-FL) und dem amino-terminalen Fragment (P-wt-NT) des Wildtyps, den carboxy-terminalen Fragmenten der beiden Parkin-Mutanten (P-289-CT und P-418-CT), dem Volllängenkonstrukt der C418R-Mutante (P-418-FL) und den beiden Wildtyp-Konstrukten TF_F2-R318 (= *Ubiquitin-like*-Domäne mit Ring 1-Domäne) und TF_F395-R465 (= *In-Between-Ring*-Region).

(siehe Abbildung 60 und Abbildung 61)

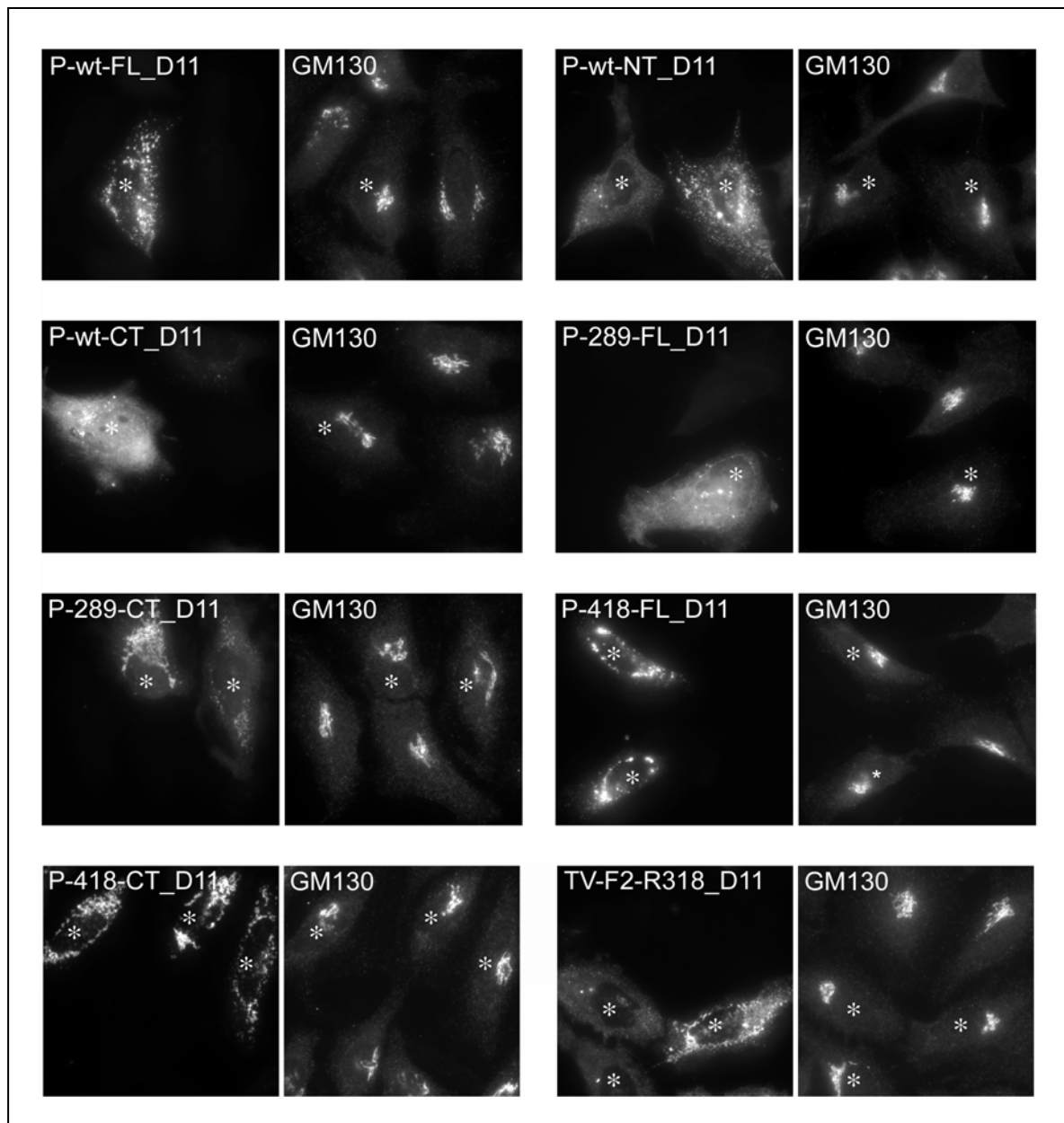


Abbildung 60: Lokalisation von Parkin und Lage des Golgi-Apparates in der Zelle. (1)

Einfach-Transfektionen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten.

HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, in denen sich jeweils ein Deckgläschen befand. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte transfiziert. Die Fragmente waren in den GATEWAYTM-Expressionsvektor pECFP-D11 kloniert. 22 h nach der Transfektion erfolgte ein Primär-Antikörper-*Staining* gegen den Golgi-Apparat (GM130). Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor[®] 568 eingesetzt. Die exprimierten Parkin-Proteine wurden über die Fluoreszenz ihres CFP-Tags lokalisiert.

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAYTM-Expressionsvektor pECFP-D11; besitzt CFP-Tag

*: Markierung transfizierter Zellen

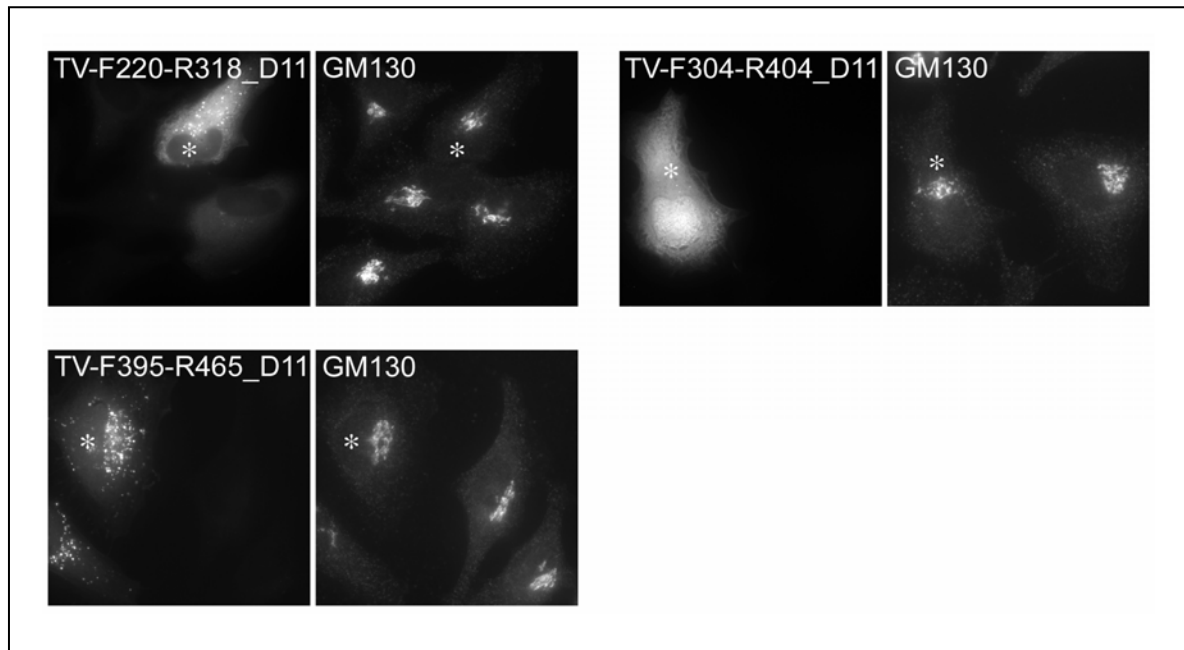


Abbildung 61: Lokalisation von Parkin und Lage des Golgi-Apparates in der Zelle. (2)

Einfach-Transfektionen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten.

HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, in denen sich jeweils ein Deckgläschen befand. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte transfiziert. Die Fragmente waren in den GATEWAYTM-Expressionsvektor pdECFP-D11 kloniert. 22 h nach der Transfektion erfolgte ein Primär-Antikörper-*Staining* gegen den Golgi-Apparat (GM130). Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor[®] 568 eingesetzt. Die exprimierten Parkin-Proteine wurden über die Fluoreszenz ihres CFP-Tags lokalisiert.

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAYTM-Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

*: Markierung transfizierter Zellen

5.7.3 Interaktion von Parkin mit der 20S Untereinheit alpha4 des in HeLa-Zellen natürlich vorkommenden 26S Proteasoms

Dieser Versuch sollte die Interaktion von Parkin mit der alpha4-Untereinheit des in HeLa-Zellen schon natürlich vorhandenen 26S Proteasoms zeigen.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten transfiziert. Nach 22 h erfolgte eine Immunfärbung der alpha4-Untereinheit des natürlichen 26S Proteasoms der HeLa-Zellen mit einem Primärantikörper. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst33342 angefärbt. Die exprimierten Proteine wurden anhand ihres fluoreszierenden CFP-Tags in der Zelle lokalisiert.

Eine Interaktion von Parkin mit dem natürlichen 26S Proteasom der HeLa-Zellen konnte nur bei zwei Konstrukten detektiert werden. Es handelt sich dabei um das Volllängenkonstrukt der Parkin-Mutante C289G (P-289-FL) und dem Volllängenkonstrukt der Parkin-Mutante C418R (P-418-FL).

Bei allen anderen Konstrukten, sogar dem Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps, konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.

(siehe Abbildung 62, Abbildung 63 und Abbildung 64)

Parkin ist löslich im Zytoplasma und nicht toxisch für die Zellen.

Bei allen Parkin-Konstrukten kommt es zu einer mal stärker oder schwächer ausgebildeten Aggregat-Bildung.

Bei folgenden Parkin-Konstrukten ist eine durch die Aggregat-Bildung resultierende Aggresomen-Bildung an den Centrosomen zu erkennen: bei dem Volllängenkonstrukt von Wildtyp (P-wt-FL) und der C289G-Mutante (P-289-FL), dem amino-terminalen Wildtyp-Konstrukt (P-wt-NT) und den beiden Wildtyp-Konstrukten TF_F2-R318 (=Ubiquitin-like-Domäne und Ring 1-Domäne) und TF_F220-R318 (= Ring 1-Domäne). (Aggresomen durch hellblaue, gestrichelte Pfeile markiert.)

(siehe Abbildung 62, Abbildung 63 und Abbildung 64)

Die Anfärbung der 20S-Untereinheit alpha4 des natürlichen 26S Proteasoms war klar und zeigte sich sowohl im Zytoplasma und als auch im Nukleus.

Die Verteilung in beiden Zellkompartimenten, Zytoplasma und Nukleus, war allerdings am deutlichsten in transfizierten Zellen zu beobachten. In nicht-transfizierte HeLa-Zellen war alpha4 vor allem im Zytoplasma lokalisiert und nur schwach im Nukleus.

(siehe Abbildung 62, Abbildung 63 und Abbildung 64)

Transfektionsansatz	Co-Lokalisation mit alpha4
P-wt-FL-D11	-
P-wt-NT-D11	-
P-wt-CT-D11	-
P-289-FL-D11	+
P-289-CT-D11	-
P-418-FL-D11	+
P-418-CT-D11	-
TF_F2-R318-D11	-
TF_F220-R318-D11	-
TF_F304-R404-D11	-
TF_F395-R465-D11	-

Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Co-Lokalisationsstudien von Parkin und der alpha4-Untereinheit des natürlichen 26S Proteasoms der Hela-Zellen.

+ : Co-Lokalisation von Parkin mit alpha4

- : keine Co-Lokalisation Parkin mit alpha4

D11: GATEWAY™ Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

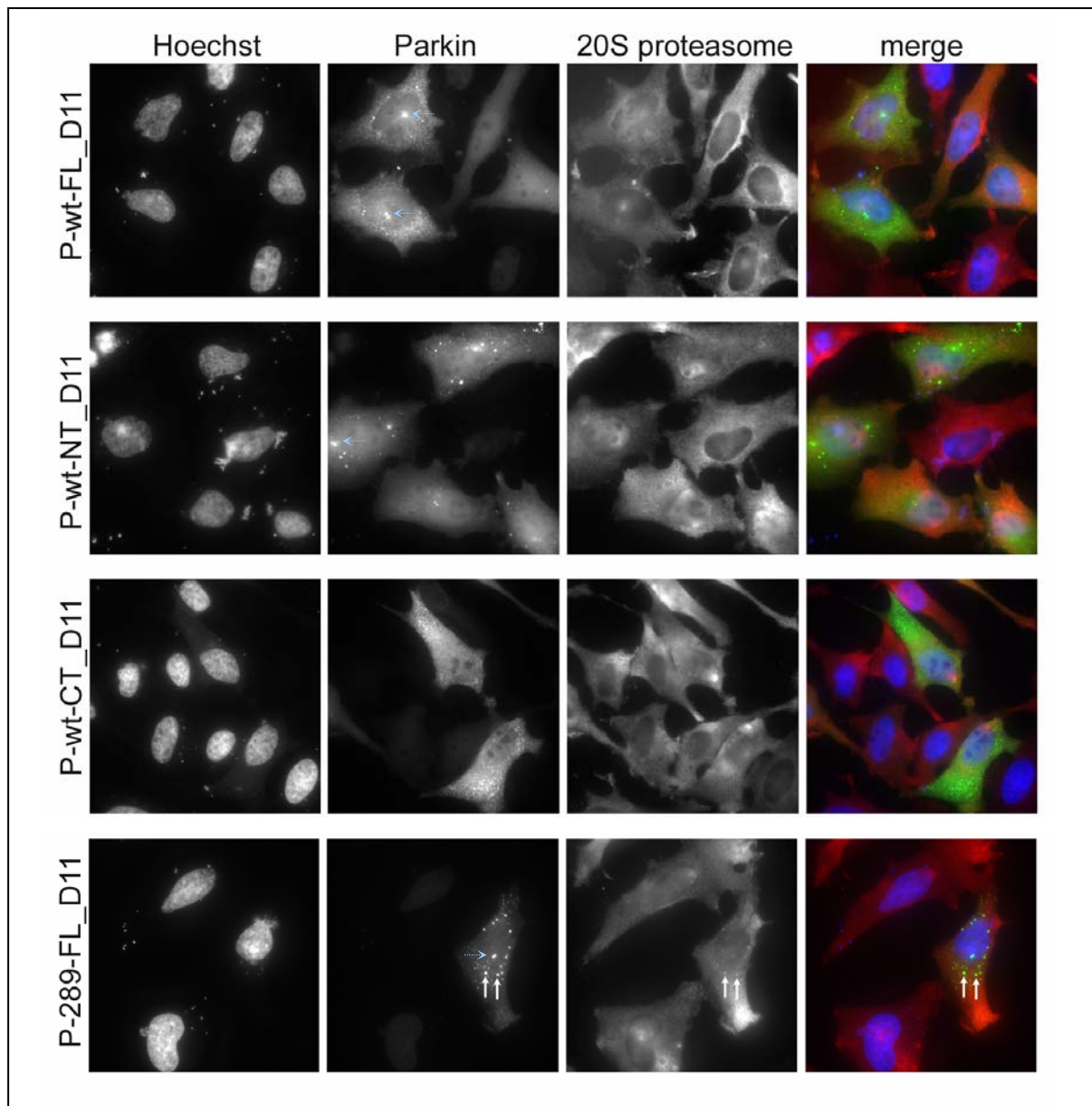


Abbildung 62: Co-Lokalisation der exprimierten Parkin-Proteine mit dem in HeLa-Zellen natürlich vorhandenen 26S Proteasom. (1)

Einfach-Transfektionen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten.

HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, in denen sich jeweils ein Deckgläschen befand. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte transfiziert. Die Fragmente waren in den GATEWAYTM-Expressionsvektor pECFP-D11 kloniert. 22 h nach der Transfektion erfolgte eine Immunofärbung mit einem Primärantikörper gegen die 20S-Untereinheit alpha4 des 26S Proteasoms. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor[®] 568 eingesetzt. Die Zellkerne wurden durch Anfärbung der DNA mit dem Farbstoff Hoechst 33342 sichtbar gemacht (blaue Fluoreszenz). Die exprimierten Parkin-Proteine wurden über die Fluoreszenz ihres CFP-Tags lokalisiert.

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAYTM Expressionsvektor pECFP-D11; besitzt CFP-Tag

—> : Co-Lokalisationen von Parkin mit der alpha4-Untereinheit des 26S Proteasoms

—> : Aggresomen an den Centrosomen

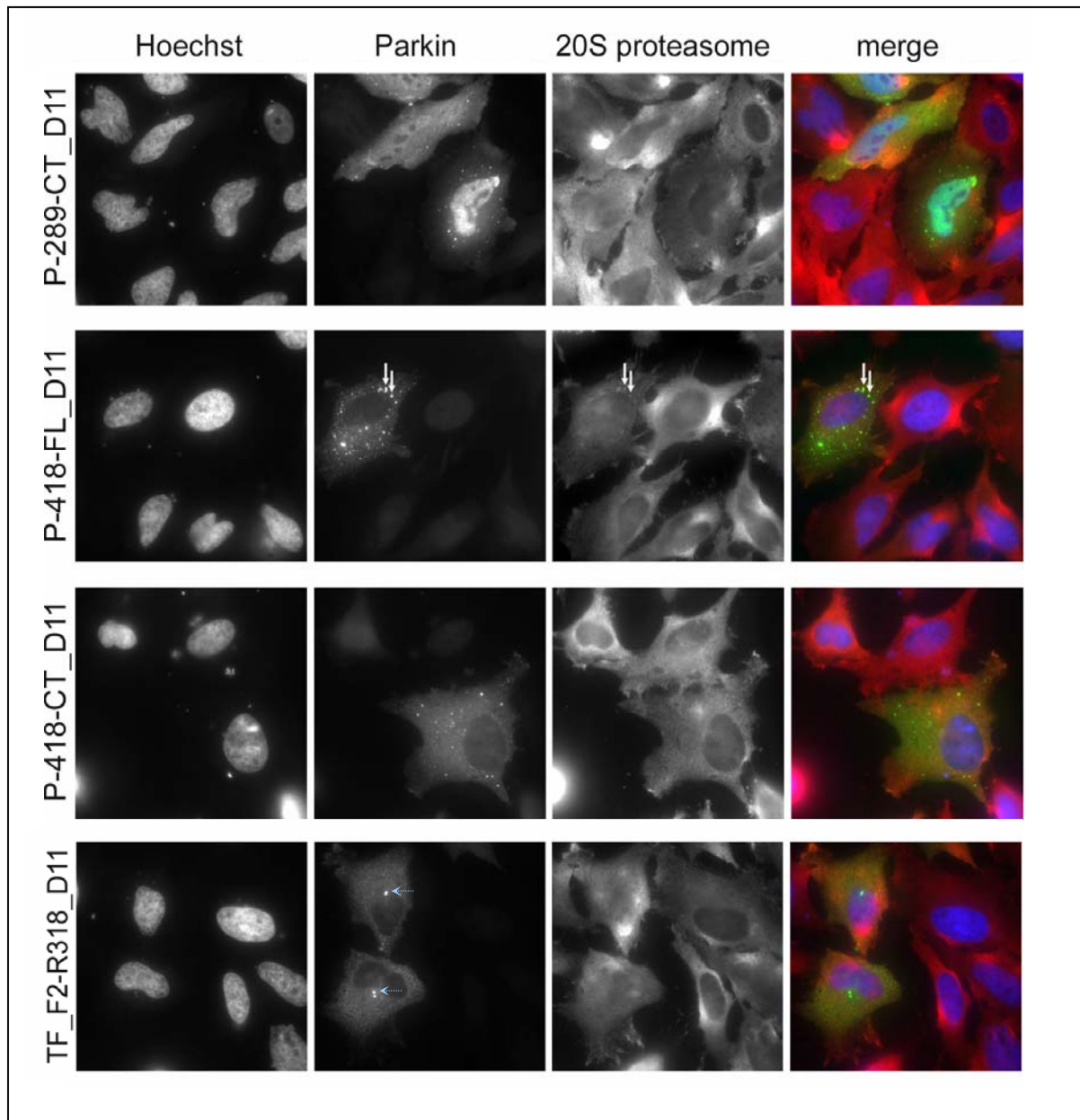


Abbildung 63: Co-Lokalisation der exprimierten Parkin-Proteine mit dem in HeLa-Zellen natürlich vorhandenen 26S Proteasom. (2)

Einfach-Transfektionen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten.

HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, in denen sich jeweils ein Deckgläschen befand. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte transfiziert. Die Fragmente waren in den GATEWAYTM-Expressionsvektor pdECFP-D11 kloniert. 22 h nach der Transfektion erfolgte eine Immunofärbung mit einem Primärantikörper gegen die 20S-Untereinheit alpha4 des 26S Proteasoms. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor[®] 568 eingesetzt. Die Zellkerne wurden durch Anfärbung der DNA mit dem Farbstoff Hoechst 33342 sichtbar gemacht (blaue Fluoreszenz). Die exprimierten Parkin-Proteine wurden über die Fluoreszenz ihres CFP-Tags lokalisiert.

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAYTM Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

→ : Co-Lokalisationen von Parkin mit der alpha4-Untereinheit des 26S Proteasoms

→ : Aggresomen an den Centrosomen

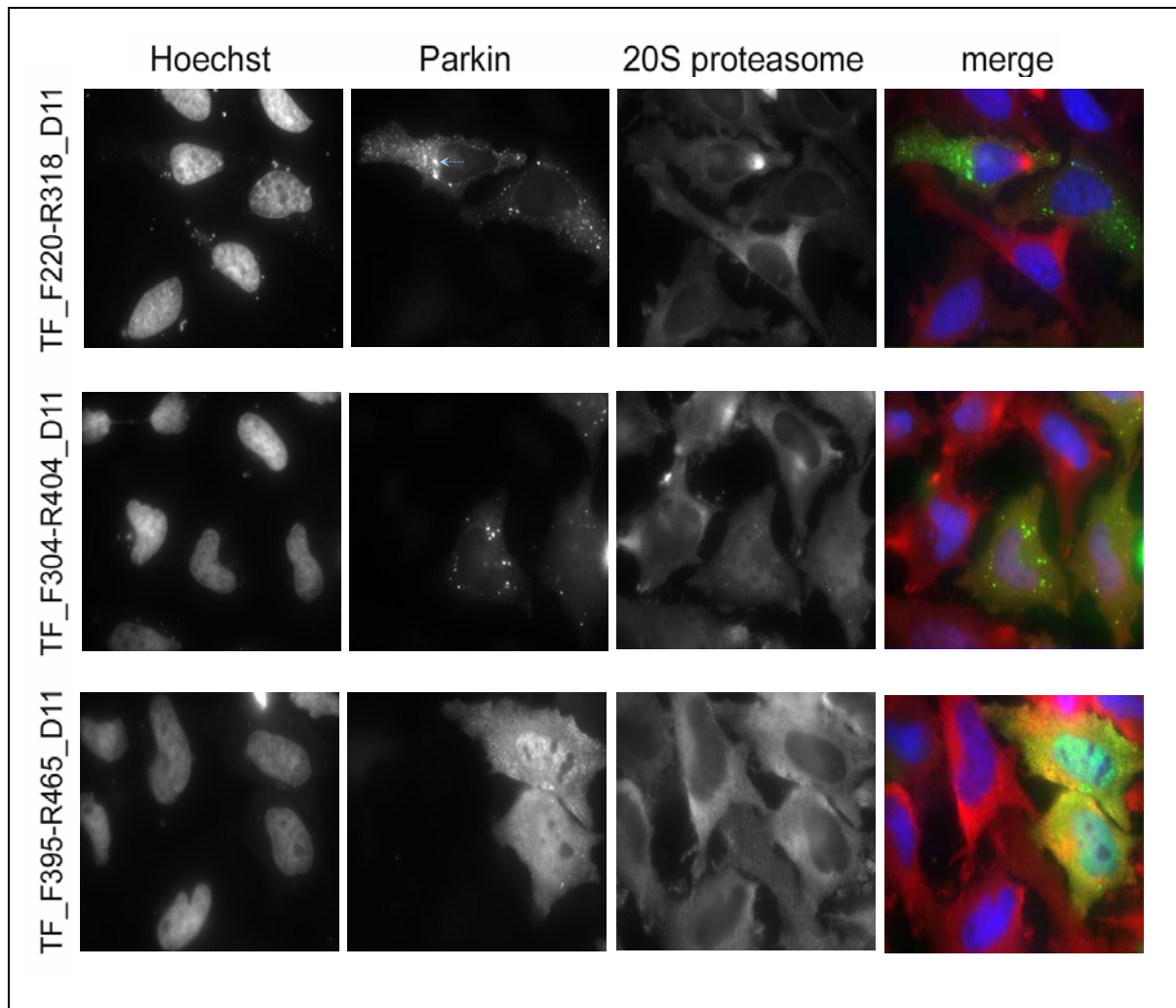


Abbildung 64: Co-Lokalisation der exprimierten Parkin-Proteine mit dem in HeLa-Zellen natürlich vorhandenen 26S Proteasom. (3)

Einfach-Transfektionen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten.

HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, in denen sich jeweils ein Deckgläschen befand. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte transfiziert. Die Fragmente waren in den GATEWAYTM-Expressionsvektor pdECFP-D11 kloniert. 22 h nach der Transfektion erfolgte eine Immunofärbung mit einem Primärantikörper gegen die 20S-Untereinheit alpha4 des 26S Proteasoms. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor[®]568 eingesetzt. Die Zellkerne wurden durch Anfärbung der DNA mit dem Farbstoff Hoechst 33342 sichtbar gemacht (blaue Fluoreszenz). Die exprimierten Parkin-Proteine wurden über die Fluoreszenz ihres CFP-Tags lokalisiert.

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAYTM Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

→ : Co-Lokalisationen von Parkin mit der alpha4-Untereinheit des 26S Proteasoms

→ : Aggresomen an den Centrosomen

5.7.4 Co-Lokalisation von Parkin und carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4

Diese Co-Lokalisationsstudien sollten zeigen, mit welchen Parkin-Konstrukten das carboxy-terminale Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4 eine Interaktion eingeht. Und damit Hinweise liefern, in welchem Bereich von Parkin die Bindungsdomäne lokalisiert ist und ob die Mutationen einen Einfluss auf die Bindung haben.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten und dem Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT) co-transfiziert. Das alpha4-Fragment wurde durch die Immunfärbung seines cMyc-Tags nachgewiesen. Die exprimierten Parkin-Proteine wurden anhand ihres fluoreszierenden CFP-Tags lokalisiert.

Eine Interaktion des carboxy-terminalen Fragmentes der proteasomalen Untereinheit alpha4 war bei folgenden Parkin-Konstrukten zu beobachten: dem Volllängenkonstrukt (P-wt-FL) und dem carboxy-terminalen Fragment des Parkin-Wildtyps (P-wt-CT), dem carboxy-terminalen Fragment der C289G-Mutante (P-289-CT), dem Volllängenkonstrukt der C418R-Mutante (P-418-FL), sowie dem Wildtypkonstrukt TF_F2-R318 (= *Ubiquitin-like*-Domäne und Ring 1-Domäne).

Bei den übrigen Konstrukten konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. (siehe Abbildung 65, Abbildung 66 und Abbildung 67)

Parkin ist löslich im Zytoplasma und nicht toxisch für die HeLa-Zellen.

Bei folgenden Konstrukten kam es zu einer überwiegend schwachen Aggregat-Bildung im Zytoplasma: bei den beiden Volllängenkonstrukten von Parkin-Wildtyp (P-wt-FL) und der C418R-Mutante (P-418-FL), bei den carboxy-terminalen Fragmenten von Wildtyp (P-wt-CT), C289G-Mutante (P-289-CT) und C418R-Mutante (P-418-CT), ebenso wie den drei Wildtyp-Konstrukten TF_F2-R318 (= *Ubiquitin-like*-Domäne und Ring 1-Domäne), TF_F304-R404 (= *In-Between-Ring*-Domäne) und TF_F395-R465 (Ring 2-Domäne).

(siehe Abbildung 65, Abbildung 66 und Abbildung 67)

Die Anfärbung des alpha4-Fragmentes war klar und zeigte sich sowohl im Zytoplasma und als auch im Nukleus. Das transfizierte alpha4-Fragment ist löslich und für die HeLa-Zellen nicht toxisch.

Co-Transfektionsansatz	Co-Lokalisation
P-wt-FL-D11 + PSMA7-CT-cMyc	+
P-wt-NT-D11 + PSMA7-CT-cMyc	-
P-wt-CT-D11 + PSMA7-CT-cMyc	+
P-289-FL-D11 + PSMA7-CT-cMyc	-
P-289-CT-D11 + PSMA7-CT-cMyc	+
P-418-FL-D11 + PSMA7-CT-cMyc	+
P-418-CT-D11 + PSMA7-CT-cMyc	-
TF_F2-R318-D11 + PSMA7-CT-cMyc	+
TF_F220-R318-D11 + PSMA7-CT-cMyc	-
TF_F304-R404-D11 + PSMA7-CT-cMyc	-
TF_F395-R465-D11 + PSMA7-CT-cMyc	-

Tabelle 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Co-Lokalisationsstudien von Parkin und alpha4.

+ : Co-Lokalisation von Parkin mit PSMA7-CT

- : keine Co-Lokalisation Parkin mit PSMA7-CT

D11: GATEWAY™ Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

cMyc: Expressionsvektor pCMV-Myc; besitzt cMyc-Tag

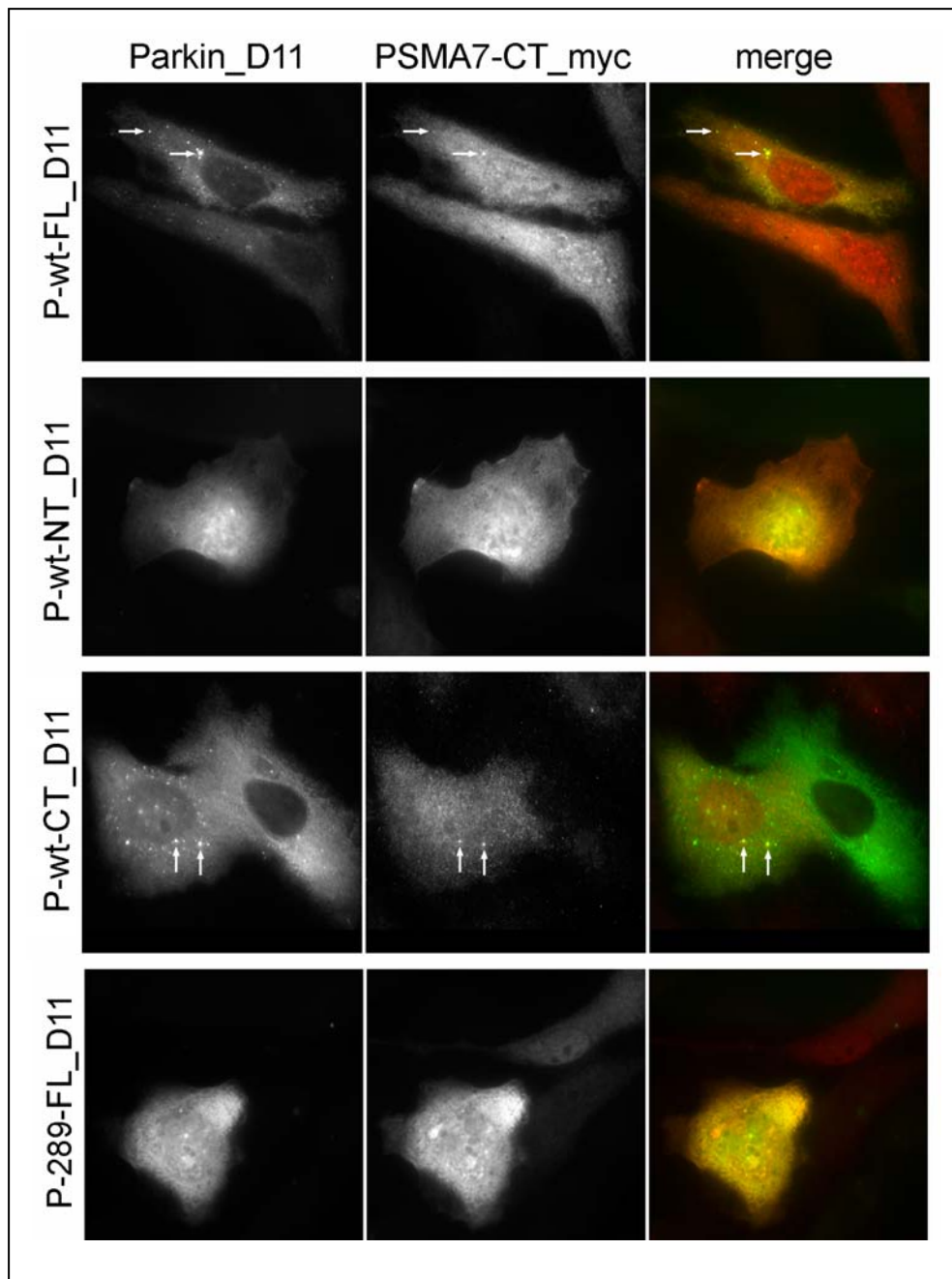


Abbildung 65: Co-Lokalisation von Parkin und dem Fragment der 20S proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT). (1)

Co-Transfektionen von PSMA7-CT mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten.

HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, in denen sich jeweils ein Deckgläschen befand. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte und dem PSMA7-CT-Fragment co-transfiziert. Die Parkin-Konstrukte lagen in dem GATEWAYTM-Expressionsvektor pdECFP-D11, das PSMA7-CT-Fragment in dem Vektor pCMV-Myc. 22 h nach der Transfektion erfolgte ein Primär-Antikörper-Staining gegen c-Myc. Als Sekundärantikörper wurde Cy3 eingesetzt. Die exprimierten Parkin-Proteine wurden über die Fluoreszenz ihres CFP-Tags lokalisiert

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAYTM-Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

Myc: Expressionsvektor pCMV-Myc; besitzt c-Myc-Tag

→ : Co-Lokalisationen von Parkin mit der alpha4-Untereinheit des 26S Proteasoms

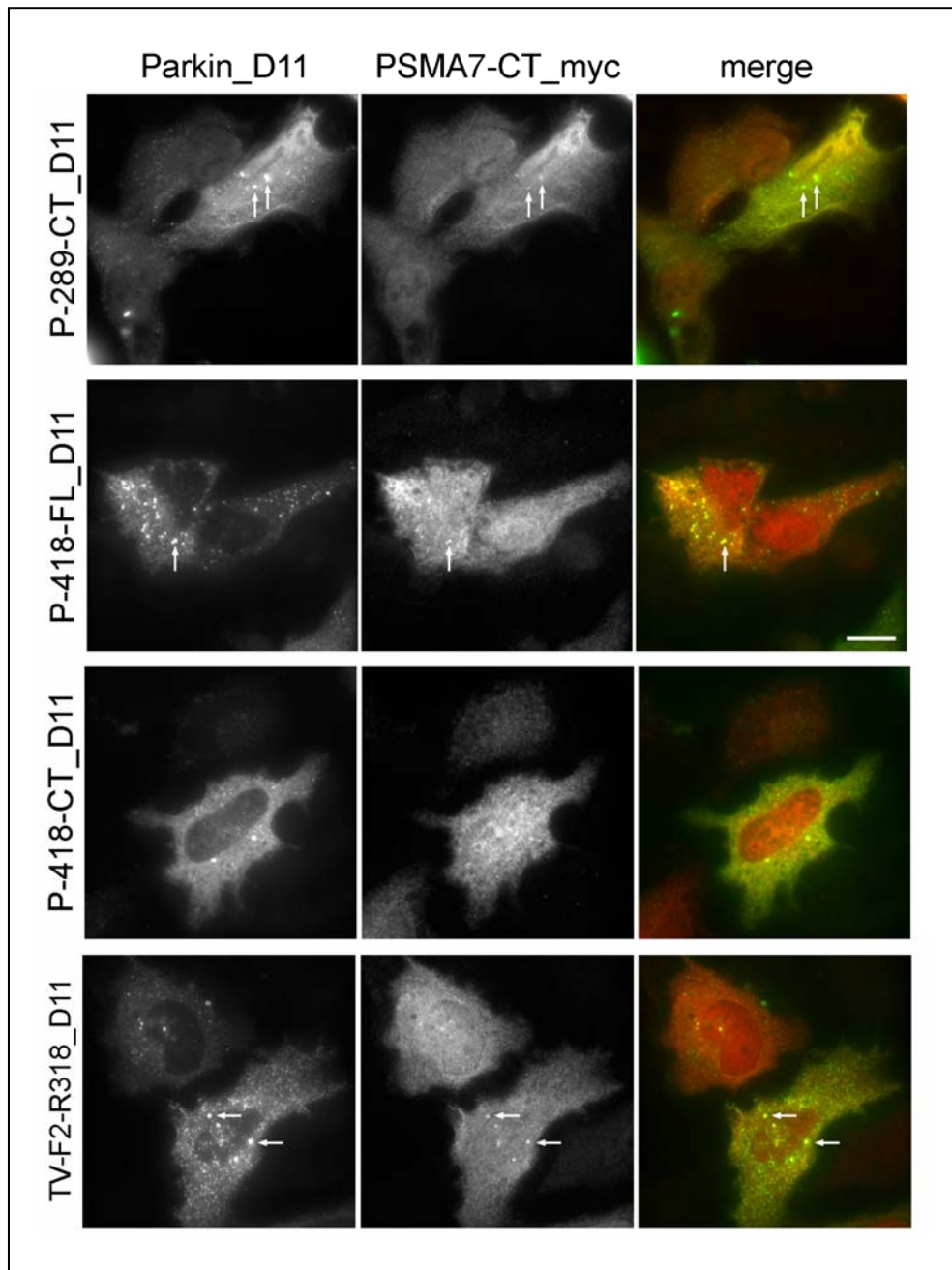


Abbildung 66: Co-Lokalisation von Parkin und dem Fragment der 20S proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT). (2)

Co-Transfektionen von PSMA7-CT mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten.

HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, in denen sich jeweils ein Deckgläschen befand. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte und dem PSMA7-CT-Fragment co-transfiziert. Die Parkin-Konstrukte lagen in dem GATEWAYTM-Expressionsvektor pdECFP-D11, das PSMA7-CT-Fragment in dem Vektor pCMV-Myc. 22 h nach der Transfektion erfolgte ein Primär-Antikörper-Staining gegen c-Myc. Als Sekundärantikörper wurde Cy3 eingesetzt. Die exprimierten Parkin-Proteine wurden über die Fluoreszenz ihres CFP-Tags lokalisiert

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAYTM-Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

Myc: Expressionsvektor pCMV-Myc; besitzt c-Myc-Tag

→ : Co-Lokalisationen von Parkin mit der alpha4-Untereinheit des 26S Proteasoms

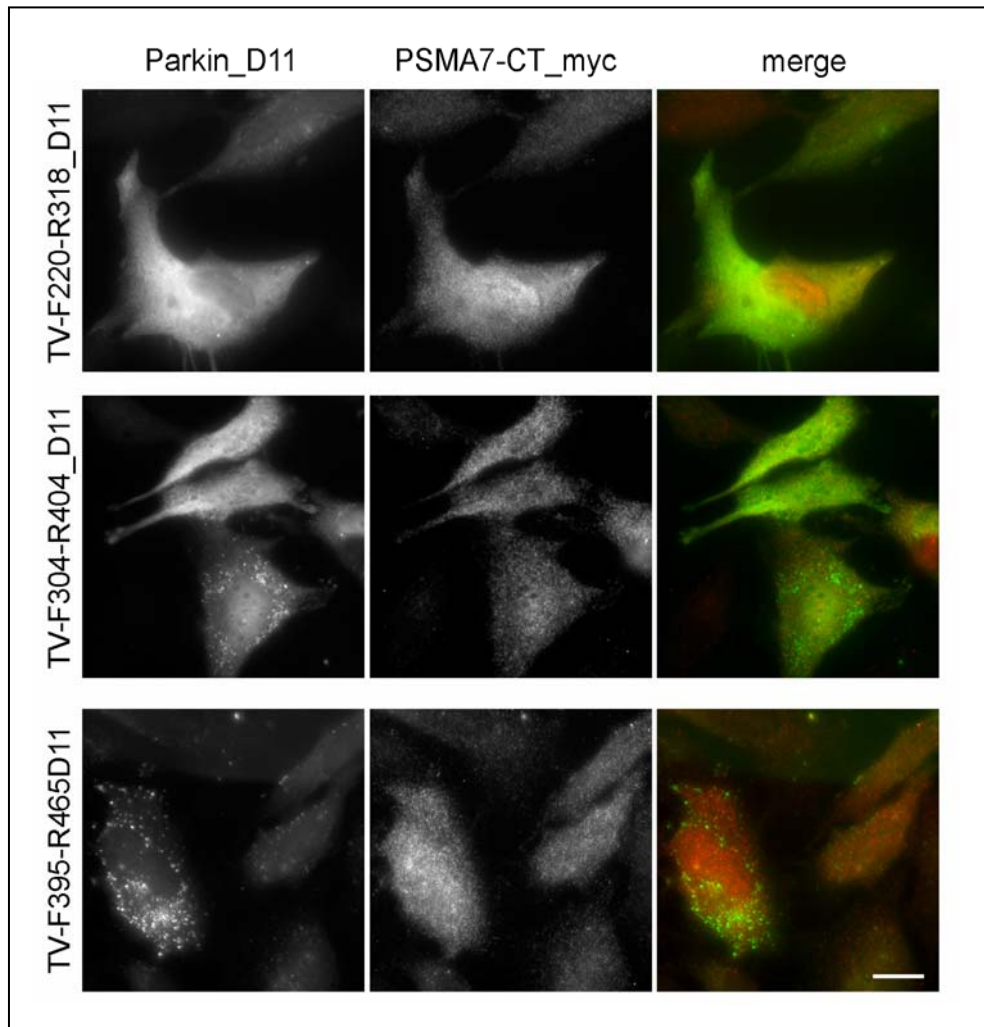


Abbildung 67: Co-Lokalisation von Parkin und dem Fragment der 20S proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT). (3)

Co-Transfektionen von PSMA7-CT mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten.

HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, in denen sich jeweils ein Deckgläschen befand. Bei einer Konfluenz von etwa 50 % mit jeweils einem der Parkin-Konstrukte und dem PSMA7-CT-Fragment co-transfiziert. Die Parkin-Konstrukte lagen in dem GATEWAY™-Expressionsvektor pdECFP-D11, das PSMA7-CT-Fragment in dem Vektor pCMV-Myc. 22 h nach der Transfektion erfolgte ein Primär-Antikörper-*Staining* gegen c-Myc. Als Sekundärantikörper wurde Cy3 eingesetzt. Die exprimierten Parkin-Proteine wurden über die Fluoreszenz ihres CFP-Tags lokalisiert

Mikroskop-Einstellungen: Invers-Mikroskop, 63x-Objektiv.

D11: GATEWAY™-Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

Myc: Expressionsvektor pCMV-Myc; besitzt c-Myc-Tag

→ : Co-Lokalisationen von Parkin mit der alpha4-Untereinheit des 26S Proteasoms

5.8 Charakterisierung der Proteinbindung von *alpha4* und seinem Interaktionspartner Parkin mittels Co-Immunpräzipitation

Proteine (und andere Makromoleküle) können aus Rohextrakten oder anderen komplexen Mischungen durch eine ganze Reihe von Methoden gereinigt werden. Die Präzipitation stellt dabei eine der einfachsten Methoden zur Trennung eines Makromolekül-Typs von anderen dar.

Für die Co-Immunpräzipitationen wurden HeLa-Zellen mit folgenden Konstrukt-Kombinationen co-transfiziert:

	Interaktionspartner A	Interaktionspartner B
Wildtyp (Volllängenkonstrukt)	P-wt-FL-D11	PSMA7-CT-HA
Wildtyp (N-terminales Fragment)	P-wt-NT-D11	PSMA7-CT-HA
Wildtyp (C-terminales Fragment)	P-wt-CT-D11	PSMA7-CT-HA
Mutante C289G (Volllängenkonstrukt)	P-289-FL-D11	PSMA7-CT-HA
Mutante C289G (C-terminales Fragment)	P-289-CT-D11	PSMA7-CT-HA
Mutante C418R (Volllängenkonstrukt)	P-418-FL-D11	PSMA7-CT-HA
Mutante C418R (C-terminales Fragment)	P-418-CT-D11	PSMA7-CT-HA
Wildtyp (Ubiquitin-like-Domäne mit Ring 1-Domäne)	TF_F2-R318-D11	PSMA7-CT-HA
Wildtyp (Ring 1-Domäne)	TF_F220-R318-D11	PSMA7-CT-HA
Wildtyp (In-Between-Ring-Domäne)	TF_F304-R404-D11	PSMA7-CT-HA
Wildtyp (Ring 2-Domäne)	TF_F395-R465-D11	PSMA7-CT-HA

D11: GATEWAY™-Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

HA: Expressionsvektor pCMV-HA; besitzt HA-Tag

Aus den Lysaten der einzelnen Co-Transfektions-Ansätze wurde das HA-getaggte PSMA7-CT-Fragment über einen immunpräzipitierenden Antikörper gegen HA *gefished*. Im Falle einer Interaktion bindet das Parkin-CFP-Fusionsprotein an PSMA7-CT, und wird mit diesem über dessen HA-Tag, über den er mit HA-Antikörper immunpräzipitiert wird, aus dem Lysat isoliert und muss dann anhand seines CFP-Tags nachweisbar sein.

Der HA-Antikörper wurde durch Zugabe von Protein G-Sepharose pelletiert.

In der anschließenden Western Blot-Analyse wurde zum Nachweis, ob eine Interaktion vorliegt oder nicht, ein Antikörper gegen den CFP-Tag der Parkin-Konstrukte verwendet.

Der Western Blot der Co-Immunpräzipitationen zeigt deutlich Interaktionen des Fragmentes der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT) mit verschiedenen Parkin-Konstrukten: mit den Vollängenkonstrukten sowohl des Parkin-Wildtyps (Spur 2) als auch der Parkin-Mutante C418R (Spur 7), und den carboxy-terminalen Fragmenten sowohl des Parkin-Wildtyps (Spur 4) als auch der beiden Mutanten C289G (Spur 6) und C418R (Spur 8).

Wobei die Interaktion von PSMA7-CT mit dem C-terminalen Fragment der C289G-Mutante deutlich schwächer zu sein scheint als die übrigen Interaktionen.

Co-Transfektionsansatz	Interaktion
P-wt-FL-D11 + PSMA7-CT-HA	+
P-wt-NT-D11 + PSMA7-CT-HA	-
P-wt-CT-D11 + PSMA7-CT-HA	+
P-289-FL-D11 + PSMA7-CT-HA	-
P-289-CT-D11 + PSMA7-CT-HA	+
P-418-FL-D11 + PSMA7-CT-HA	+
P-418-CT-D11 + PSMA7-CT-HA	+
TF_F2-R318-D11 + PSMA7-CT-HA	-
TF_F220-R318-D11 + PSMA7-CT-HA	+
TF_F304-R404-D11 + PSMA7-CT-HA	-
TF_F395-R465-D11 + PSMA7-CT-HA	+

Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationen der verschiedenen Parkin-Konstrukte mit alpha4.

+ : Interaktion von Parkin mit PSMA7-CT

- : keine Interaktion

D11: GATEWAY™ Expressionsvektor pdECFP-D11; besitzt CFP-Tag

HA: Expressionsvektor pCMV-HA; besitzt HA-Tag

Ein Western Blot mit den nicht-präzipitierten Lysaten und einem GFP-Antikörper zum Nachweis, dass die CFP-Parkin-Fusionsproteine in den HeLa-Zellen exprimiert wurden, ist nicht nötig. Diesen Nachweis lieferte die Immunfluoreszenz schon. Anhand der Immunfluoreszenz lässt sich auch die Transfektionsrate für jedes Fragment abschätzen. Auch auf eine Kontrolle der nicht-präzipitierten Lysate im Western Blot mit einem HA-Antikörper zum Nachweis, dass der Interaktionspartner PSMA7-CT ebenfalls exprimiert wurde, ist nicht nötig. Auch dies wird anhand der Ergebnisse der Immunfluoreszenz deutlich. Die Expression sollte zudem allen Ansätzen gleich sein.

Allerdings wurde zur Kontrolle, ob der GFP-Antikörper funktioniert, noch Lysat des leeren Vektors pdECFP-D11 mit aufgetragen. Die Probe wurde genauso behandelt wie die übrigen Proben auch: d.h. die sie wurde halbiert und die eine Hälfte mit dem immunpräzipitierenden Antikörper inkubiert, die andere Hälfte nicht.

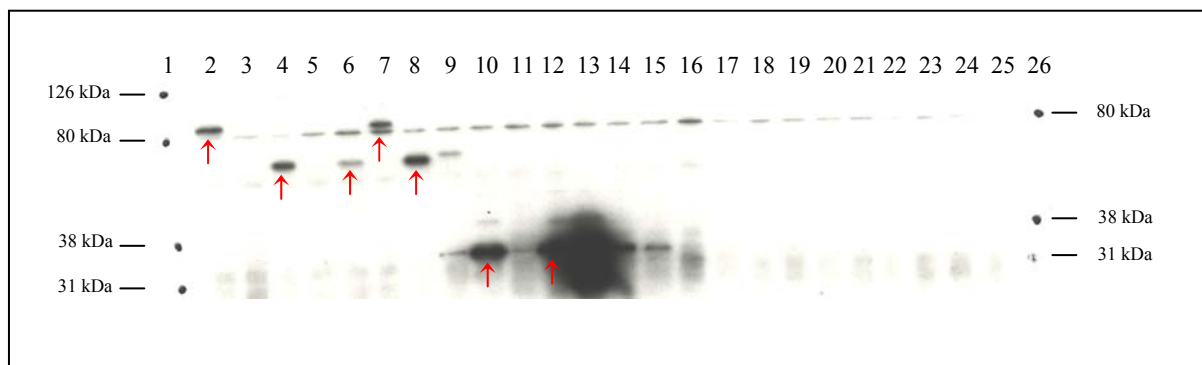


Abbildung 68: Co-Immunpräzipitation der verschiedenen Parkin-Konstrukte mit dem carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4.

Immunpräzipitierung von PSMA7-CT_HA mit einem HA-Antikörper als Präzipitierungs-Antikörper. Je 40 µL Co-Immunoprecipitat auf 10-20 %iges Criterion™ Tris-HCl-Gradientengel (1x TGS-Laufpuffer) aufgetragen. Elektrophorese: 400 mA, 200 V, 150 W für 1 h. Blotten: 1000 mA, 100 V, 150 W für 1 h.

Spur 1: Marker; Spur 2: P-wt-FL_D11; Spur 3: P-wt-NT_D11; Spur 4: P-wt-CT_D11; Spur 5: P-289-FL_D11; Spur 6: P-289-CT_D11; Spur 7: P-418-FL_D11; Spur 8: P-418-CT_D11; Spur 9: TF_F2-R318_D11; Spur 10: TF_F220-318_D11; Spur 11: TF_F304-R404_D11; Spur 12: TF_F395-R465_D11; Spur 13: pdECFP-Lysat; Spur 14: P-wt-FL_D11; Spur 15: P-wt-NT_D11; Spur 16: P-wt-CT_D11; Spur 17: P-289-FL_D11; Spur 18: P-289-CT_D11; Spur 19: P-418_D11; Spur 20: P-418_D11; Spur 21: TF_F2-R318_D11; Spur 22: TF_F220-318_D11; Spur 23: TF_F304-R404_D11; Spur 24: TF_F395-R465_D11; Spur 25: pdECFP-Lysat; Spur 26: Marker.

Spuren 2 – 12, 25: mit Präzipitations-Antikörper Anti-HA

Spuren 13 –24: ohne Präzipitations-Antikörper Anti-HA

➡ mit PSMA7-CT-HA co-präzipitiertes Parkin = Interaktion

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die alpha4-Untereinheit des 20S-Kernkomplexes des 26S Proteasoms als neuer Interaktionspartner von Parkin identifiziert.

Zum ersten Mal wurde über verschiedene Methoden (Yeast-Two-Hybrid-Assay, Co-Immunpräzipitationen, Co-Lokalisationsstudien) gezeigt, dass Parkin nicht nur mit den 19S-Kappenkomplexen interagiert (E. Sakata *et al.*, 2003), sondern auch mit dem 20S-Kernkomplex des 26S Proteasoms.

Die Ergebnisse der verschiedenen Experimente fallen für die einzelnen Parkin-Konstrukte sehr unterschiedlich aus. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen Parkin und der proteasomalen Untereinheit alpha4 sehr schwach und/oder transient ist.

6.1 Parkin interagiert mit der Untereinheit alpha4 des 26S Proteasoms

In allen Versuchen, mit Ausnahme der Größenausschluss-Chromatographie (siehe S.156 ff), konnte die Interaktion des carboxy-terminalen Fragmentes der proteasomalen Untereinheit alpha4 mit dem Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps eindeutig gezeigt werden. Wohingegen in keinem der Versuche eine Interaktion des alpha4-Fragmentes mit dem amino-terminalen Fragment des Parkin-Wildtyps nachgewiesen werden konnte.

So war die Interaktion des alpha4-Fragmentes mit dem Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps sowohl in den Yeast-Two-Hybrid-Assays und in den Pull Down-Experimenten, als auch in den Co-Lokalisationsstudien (mit beiden Interaktionspartnern co-transfizierten HeLa-Zellen) und den Co-Immunpräzipitationen nachzuweisen. Lediglich bei den Co-Lokalisationsstudien von Parkin mit dem in HeLa-Zellen natürlich vorhandenen 26S Proteasom konnte die Interaktion des Volllängenkonstruktes des Parkin-Wildtyps nicht detektiert werden. Dies untermauert aber die Hypothese, dass es sich bei der Interaktion von Parkin mit der proteasomalen Untereinheit alpha4 um eine transiente Interaktion handelt.

6.1.1 Lokalisation der Bindungsdomäne im C-Terminus von Parkin

Die Ergebnisse, dass das alpha4-Fragment immer an das Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps bindet, an das amino-terminale Fragment des Parkin-Wildtyps dagegen nie, geben einen Hinweis darauf, dass die Bindungsdomäne in der carboxy-terminalen Ring-Box-Domäne von Parkin (Aminosäuren 192 – 465) lokalisiert sein muss, und nicht in dem amino-terminal gelegenen Bereich der *Ubiquitin-like*- und *Unique Parkin*-Domäne (Aminosäuren 1 – 191).

Dies könnte evtl. als Erklärung dienen, warum die Mutationen, die beide im carboxy-terminalen Bereich von Parkin liegen (C289G in der Ring 1-Domäne und C418R in der Ring 2-Domäne), möglicherweise krankheitsauslösenden Charakter besitzen. Aus diesem Grund wurden auch dahingehend Untersuchungen durchgeführt, ob diese Mutationen die Bindung von Parkin mit alpha4 beeinflussen.

Die Untersuchung des Einflusses dieser Mutationen ergab sehr unterschiedliche Ergebnisse für die einzelnen Mutations-Konstrukte in den verschiedenen Versuchen. Dies untermauert erneut die Vermutung, dass die Interaktion der proteasomalen Untereinheit alpha4 mit Parkin einen schwachen und/oder transienten Charakter besitzt.

Die Ergebnisse für die carboxy-terminalen Fragmente zeigen aber deutlich, dass die Bindungsdomäne in dem carboxy-terminalen Bereich von Parkin liegt. Denn sowohl bei den Pull Down-Experimenten, als auch bei den Co-Lokalisationsstudien und den Co-Immunpräzipitationen wurde immer mit mindestens einem der verschiedenen C-terminalen Parkin-Konstrukte (Wildtyp, C289G-Mutante, C418R-Mutante) eine Interaktion gezeigt.

6.1.1.1 Mutationen im C-Terminus von Parkin heben die Interaktion nicht auf

Eine erste Vermutung bzgl. des Einflusses der Mutationen auf die Bindung von alpha4 an Parkin kam aufgrund der Ergebnisse der Yeast-Two-Hybrid-Assays auf (siehe 5.1.3). Dort konnte für keines der Volllängenkonstrukte der beiden Mutanten eine Interaktion mit dem alpha4-Fragment nachgewiesen werden. Deswegen wurde zuerst darauf geschlossen, dass jede der Mutationen alleine die Bindung aufhebt. Dies würde bedeuten, dass es nicht nur eine Bindungsdomäne gibt, sondern (mindestens) zwei: eine in der Ring 1-Domäne, eine zweite in der Ring 2-Domäne.

Diese Vermutung, dass die Mutationen die Interaktion aufheben, wurde allerdings durch die Ergebnisse der nachfolgenden Versuche verworfen.

Bei den Pull Down-Experimenten (siehe 5.5.3) wurde sowohl für das Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps als auch für das Volllängenkonstrukt der Parkin-Mutante C418R eine Interaktion mit dem alpha4-Fragment nachgewiesen. Ebenso wurde eine Interaktion sowohl für das C-terminale Fragment des Wildtyps als auch für das C-terminale Fragment der Parkin-Mutante C418R (zumindest bei der Präzipitation des alpha4-Fragmentes) detektiert.

Die mögliche quantitative Änderung der Bindungsstärke unter Einfluss der Mutationen wurde nicht untersucht.

Die Tatsache, dass neben dem Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps auch sein carboxy-terminales Fragment bindet, sein amino-terminales Fragment aber nicht, untermauert die Hypothese, die auf der Basis der Ergebnisse der übrigen Versuche (Yeast-Two-Hybrid-Assays, Co-Lokalisationsstudien in mit beiden Interaktionspartnern co-transfizierten HeLa-Zellen und Co-Immunpräzipitationen) aufgestellt wurde, nämlich dass die Bindungsdomäne in der C-terminalen Ring-Box-Domäne von Parkin lokalisiert ist.

Die Tatsache, dass bei den Pull Down-Experimenten sowohl das Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps mit dem alpha4-Fragment bindet, als auch das Volllängenkonstrukt der Parkin-Mutante C418R, legt die Vermutung nahe, dass diese Mutation in der Ring 2-Domäne zumindest keinen so starken Einfluss auf die Bindung hat, dass sie dadurch aufgehoben wird.

Auch bei den Co-Lokalisationsstudien (siehe 5.7.3 und 5.7.4) und den Co-Immunpräzipitationen (siehe 5.8) wurde eine Interaktion des Volllängenkonstruktes der C418R-Mutante mit dem alpha4-Fragment nachgewiesen, was die Annahme untermauert.

Auch die Ergebnisse der Co-Lokalisationsstudien und der Co-Immunpräzipitationen für die Parkin-Mutante C289G (Volllängenkonstrukt und C-terminales Fragment) ließen den Rückschluss zu, dass auch diese Mutation in der Ring 1-Domäne die Bindung von alpha4 an Parkin nicht aufhebt.

Die Beobachtungen, dass diese Mutationen im C-Terminus von Parkin die Interaktion mit der proteasomalen Untereinheit alpha4 nicht aufheben, wurden auch durch Co-Immunpräzipitationen mit HEK289-Zellen bestätigt (J. C. Dächsel *et al.*, 2005).

6.1.2 Pull Down-Experiment: Lokalisierung der Bindungsdomäne

Das Ergebnis der Pull Down-Experimente (siehe 5.5.3) zeigt, dass es offensichtlich einen Unterschied macht, über welchen Interaktionspartner (co-)präzipitiert wird, zumindest für die Interaktion des alpha4-Fragmentes mit dem carboxy-terminalen Fragment der Parkin-Mutante C418R.

Die Präzipitation des alpha4-Fragmentes mit nachfolgender Co-Präzipitation von Parkin ergab, dass sowohl das Volllängenkonstrukt der C418R-Mutante als auch ihr carboxy-terminales Fragment mit dem alpha4-Fragment interagieren. Dies deutet darauf hin, dass die Mutation in der Ring 2-Domäne auf die Bindung zwischen Parkin und alpha4 nicht aufhebt.

Das Ergebnis der Präzipitation von Parkin mit anschließender Co-Präzipitation des alpha4-Fragmentes dagegen zeigte nur für das Volllängenkonstrukt der C418R-Mutante eine Interaktion, nicht aber für ihr C-terminales Fragment. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass in der Ring 2-Domäne eine Bindungsstelle für die proteasomale Untereinheit alpha4 liegt. Gleichzeitig deutet das Ergebnis aber auch darauf hin, dass die Interaktion nicht auf einer einzigen Bindung beruht. Die Mutation in der Ring 2-Domäne scheint zwar die Bindung an dieser Stelle aufzuheben, aber offensichtlich gibt es neben dieser Bindungsstelle in der Ring 2-Domäne noch (mindestens) eine weitere Bindungsdomäne, die auszureichen scheint, um die Interaktion zu gewährleisten.

Diese zusätzliche Bindungsstelle scheint allerdings nicht im Bereich der *Ubiquitin-like*- und *Unique Parkin*-Domäne im Amino-Terminus (Aminosäuren 1 – 191) zu liegen, denn das N-terminale Fragment des Parkin-Wildtyps zeigte bei keinem der durchgeführten Versuche eine Interaktion mit der proteasomalen Untereinheit alpha4. Dies könnte bedeuten, dass die zusätzliche Bindungsstelle direkt in der Klonierungsstelle für die Aufteilung in N- und C-terminales Fragment lag: genau an dem Übergang des per Klonierung definierten N-Terminus zum C-Terminus an Aminosäure 191/192. Und dass diese zusätzliche Bindungsstelle durch die Klonierung zerstört wurde.

Auch die Tatsache, dass bei den Co-Lokalisationsstudien mit dem natürlichen 26S Proteasom die C-terminalen Fragmente der beiden Mutanten keine Interaktion zeigt, ihre Volllängenkonstrukte dagegen schon, verstärkt die Vermutung, dass es außerhalb des carboxy-terminalen Bereiches (Aminosäuren 192 – 465) eine weitere Bindungsdomäne geben muss.

Dieses Phänomen, dass es einen Unterschied macht, über welchen Interaktionspartner (co-) präzipitiert wird, scheint aber auch bei anderen Arbeitsgruppen aufzutreten. So berichtet Sakata *et al.* (2003) nur von der Co-Präzipitation von Parkin mit dem Proteasom, nicht aber von der Co-Präzipitation in der entgegengesetzten Richtung (Co-Präzipitation des Proteasoms mit Parkin). Auch Dächsel *et al.* (2005) konnten das 26S oder 20S Proteasom nach Immunpräzipitation von Parkin nicht detektieren.

6.2 Interaktion von alpha4 und Parkin besitzt schwachen und/oder transienten Charakter

Der schwache und/oder transiente Charakter der Interaktion der proteasomalen Untereinheit alpha4 mit Parkin wird vor allem durch die Ergebnisse der Co-Lokalisationsstudien verdeutlicht (siehe 5.7.3 und 5.7.4).

Schon der Vergleich der beiden Co-Lokalisationsstudien untereinander verstärkt die Vermutung einer schwachen und/oder transienten Interaktion:

So war bei den Co-Lokalisationsstudien mit dem natürlichen 26S Proteasom der HeLa-Zellen keine Interaktion mit einem der Wildtyp-Konstrukte nachzuweisen, aber mit den Volllängenkonstrukten der beiden Mutanten. Bei den Co-Lokalisationsstudien in mit beiden Interaktionspartnern co-transfizierten HeLa-Zellen dagegen wurde eine Interaktion des alpha4-Fragmentes mit verschiedenen Wildtyp-Konstrukten (Volllängenkonstrukt, C-terminales Fragment, Fragment für *Ubiquitin-like*-Domäne mit Ring 1-Domäne) detektiert. Des weiteren konnte bei den Co-Lokalisationsstudien mit dem natürlichen 26S Proteasom eine eindeutige Interaktion für das Volllängenkonstrukt der C289G-Mutante nachgewiesen werden, nicht aber für ihr carboxy-terminales Fragment. Wohingegen die Co-Lokalisationsstudien der mit beiden Interaktionspartnern co-transfizierten HeLa-Zellen ein gegenteiliges Ergebnis ergaben: nämlich eine Interaktion für das C-terminale Fragment der C289G-Mutante, nicht aber für ihr Volllängenkonstrukt.

Auch der Vergleich der Ergebnisse der beiden Co-Lokalisationsstudien mit den Ergebnissen der übrigen Testreihen (Yeast-Two-Hybrid-Assays, Pull Down-Experimente und Co-Immunpräzipitationen) zeigt so unterschiedliche Ergebnisse bzgl. der Interaktion von alpha4 mit den verschiedenen Parkin-Konstrukten, dass sich die Hypothese des schwachen und/oder transienten Charakters der Interaktion noch einmal verstärkt:

So konnte bei den Yeast-Two-Hybrid-Assays (siehe 5.1.3) und den Pull Down-Experimenten (siehe 5.5.3) immer die Interaktion des carboxy-terminalen Fragmentes der proteasomalen Untereinheit alpha4 mit dem Volllängenkonstrukt des Parkin-Wildtyps gezeigt werden, bei den Co-Lokalisationsstudien mit dem natürlichen 26S Proteasom jedoch nicht. Während allerdings bei den Yeast-Two-Hybrid-Assays die Interaktion ausschließlich mit dem Volllängenkonstrukt des Wildtyps nachgewiesen wurde, sonst aber mit keinem anderen Konstrukt, wurde bei den Co-Lokalisationsstudien von Parkin mit dem natürlichen 26S Proteasom der HeLa-Zellen auch eine Interaktion mit den Volllängenkonstrukten beider Mutanten detektiert. Ebenso verdeutlichen die Ergebnisse der Co-Lokalisationsstudien und Co-Immunpräzipitationen (siehe 5.8) für die Konstrukte der C289G-Mutante den schwachen und/oder transienten Charakter der Interaktion zwischen alpha4 und Parkin. So konnte bei den Co-Lokalisationsstudien von Parkin mit der alpha4-Untereinheit des natürlichen 26S

Proteasoms der HeLa-Zellen eine eindeutige Interaktion für das Volllängenkonstrukt der C289G-Mutante nachgewiesen werden, nicht aber für ihr carboxy-terminales Fragment. Die Co-Immunpräzipitationen ergaben ein gegenteiliges Ergebnis: so wurde eine Interaktion für das C-terminale Fragment der C289G-Mutante detektiert, nicht aber für ihr Volllängenkonstrukt. Auch die Tatsache, dass bei der Präzipitation des alpha4-Fragmentes mit nachfolgender Co-Präzipitation von Parkin eine Interaktion für das carboxy-terminale Fragment der Parkin-Mutante C418R gezeigt wurde, bei der Präzipitation von Parkin mit anschließender Co-Präzipitation des alpha4-Fragmentes dagegen nicht, ließ die Annahme zu, dass es sich bei der Interaktion von alpha4 mit Parkin um eine schwache und/oder transiente Bindung handelt.

6.3 Aggresomen-Bildung in HeLa-Zellen nach Parkin-Transfektion

Bei zu starker Expression assoziiert Parkin an den Centrosomen (siehe 5.7.1 und 5.7.3), was ein Absterben der Zelle zur Folge hat.

Dabei liegt der Grund für das Absterben der Zelle aber nicht an dem exprimierten Fremdprotein Parkin an sich, sondern daran, dass sich der Proteinüberschuss in Form von Aggresomen über die Centrosome legt. Als Folge dessen kann das Centrosom nicht mehr arbeiten, die Zelle kann sich nicht mehr teilen und es kommt letztlich zum Absterben der Zelle.

Das Centrosom ist das für die Zelle überlebenswichtige Mikrotubuli-Organisationszentrum. Dieser Komplex liegt in Interphase-Zellen auf der Seite des Zellkerns, über der Außenfläche der Kernhülle und enthält zwei Centriolen und das pericentriolare Material.

Das Phänomen der Aggresomen-Bildung wurde in der Zellkultur als Antwort von Zellen auf eine anormale Protein-Bildung, wie sie mutierte, toxische Proteine oder auch exprimierte Fremdproteine darstellen, beobachtet (B. A. French *et al.*, 2001). Die Zelle versucht den Überschuss an solchen Proteinen durch Aggregat-Bildung zu entfernen. Diese Aggregate werden nach und nach, entlang von Mikrotubuli-Bahnen, zum Aggresom transportiert, das sich an den Centrosomen bildet (R. R. Kopito, 2000). Bei Aggresomen handelt es sich also um zytoplasmatische Einschlusskörper (M. M. K. Muqit *et al.*, 2003), in denen dann der Abbau der Protein-Aggregate erfolgt.

Der Transport der Aggregate entlang von Mikrotubuli-Bahnen erklärt möglicherweise, warum sich die Aggresomen gerade an den Centrosomen bilden: Mikrotubuli sind meist mit einem Ende am Centrosom verankert, während das andere Ende frei ins Zytoplasma ragt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Aggresomen die Verteilung der Intermediärfilamente im Zytoplasma verändern. So ist um Aggresomen herum Vimentin, ein Filamentprotein des Zytoskeletts, stellenweise kollabiert (M. M. K. Muqit *et al.*, 2003).

Intermediärfilamente sind Seil-ähnliche Fasern und umgeben den Zellkern als umfangreiches Geflecht. Es erstreckt sich bis zur Zellperipherie und steht mit der Plasmamembran in Wechselwirkung.

Das Intermediärfilament Vimentin bildet um die Außenseite des Aggresoms eine Käfig-ähnliche Struktur (M. M. K. Muqit *et al.*, 2003). Durch den Transport der Aggregate entlang gerader oder gekrümmter Mikrotubuli-Bahnen innerhalb des Zytoplasmas (mit einer Geschwindigkeit von 0.32 $\mu\text{m}/\text{min}$) kann es zum Kollabieren der Intermediärfilamente

kommen. Denn die Filamente aller drei Typen, die Mikrotubuli, die Actin-Filamente und die Intermediärfilamente, sind untereinander verbunden.

Zur Überprüfung des vermeintlichen Einflusses von Aggresomen auf die Verteilung der Intermediärfilamente wurde eine Immunfärbung mit einem Antikörper gegen Vimentin durchgeführt (siehe 5.7.2.1).

Allerdings konnten die Ergebnisse dieser Immunfärbung die in Literatur gefundenen Aussage der Intermediär-Veränderung aufgrund der Anlagerung von Aggresomen nicht bestätigen.

Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass es Interaktionen zwischen dem Golgi-Apparat und Mikrotubuli gibt.

Aus diesem Grund wurde zudem untersucht, ob die Anlagerung von Aggresomen bzw. durch den damit verbundenen Transport von Protein-Aggregaten entlang von Mikrotubuli-Bahnen auch die Lage des Golgi-Apparates verändert. Der Golgi-Apparat ist normalerweise um das Centrosom lokalisiert (R. R. Kopito, 2000).

Der Golgi-Apparat ist ein in allen eukaryontischen Zellen nachweisbares Zellorganell und bezeichnet die Gesamtheit aller Dictysomen in einer Zelle.

Zum Lokalisierung des Golgi-Apparates in der Zelle wurde eine Immunfärbung mit einem Golgi-Marker durchgeführt (siehe 5.7.2.2).

Die Vermutung, dass durch den Transport entlang von Mikrotubuli-Bahnen sich die Lage des Golgi-Apparates verschiebt, bestätigte sich nicht.

Da die Überexpression von Parkin zu einem, von seiner Funktion als E3 Protein-Ligase unabhängigen, Absterben der Zellen führt, ist geplant, Parkin unter einem schwächeren Promotor bzw. unter einem regulierbaren Promotor in HeLa-Zellen zu exprimieren.

6.4 Nukleäre und cytoplasmatische Lokalisation von alpha4

Bei dem Löslichkeitstest (siehe 5.7.1), der als Vorversuch für die Co-Lokalisationsstudien durchgeführt wurde, wurde das alpha4-Fragment als YFP-Fusionsprotein ausschließlich im Kern lokalisiert (siehe Abbildung 57). Es ist allerdings auffällig, dass im Zytoplasma das alpha4-Fragment nicht zu detektieren war.

Proteasomen findet man sowohl im Zytosol als auch im Nukleus eukaryontischer Zellen (M. Bochtler *et al.*, 1999). Auch das Vorhandensein der einzelnen Hauptkomponenten des Proteasoms, der 19S-Kappenkomplex und der 20S-Zylinder, wurde sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma verschiedener Spezies gezeigt (J-M. Peters *et al.*, 1994).

Für die Lokalisation eines Proteins in der Zelle sind normalerweise Transportfaktoren nötig, die das entsprechende Signal umsetzen, wohin das Protein transportiert werden soll. So werden Proteine, die im Kern lokalisiert sind, nicht dort exprimiert, sondern im Zytoplasma. Vom Zytoplasma aus werden solche kernständigen Proteine dann aufgrund der entsprechenden Signalfaktoren in den Kern transportiert.

Dass das carboxy-terminale Fragment der alpha4-Untereinheit nicht im Zytoplasma zu

detektieren war, sondern ausschließlich im Kern, könnte daran gelegen haben, dass der YFP-Tag eine Signalstelle für einen solchen Faktor blockiert, zumindest die Signalstelle für den Faktor, der das Signal zu Lokalisation der alpha4-Untereinheit im Zytoplasma gibt. Es scheint aber noch eine weitere Signalstelle zu existieren: eine Signalstelle für einen Faktor, der das Signal zum Transport der alpha4-Untereinheit in den Kern gibt.

Eine weitere Erklärung für die ausschließliche Lokalisation des exprimierten alpha4-Proteins könnte sein, dass es sich lediglich um ein Teil der alpha4-Einheit (die letzten 70 Aminosäuren) handelt und die Signalstelle für den Lokalisationsfaktor im Zytoplasma fehlt.

Bei den Co-Lokalisationsstudien mit dem natürlichen 26S Proteasom der HeLa-Zellen war die Anfärbung der alpha4-Untereinheit klar, und zeigte sich sowohl im Zytoplasma als auch mit einigen Spots im Nukleus (siehe Abbildung 62 – Abbildung 64).

Die Verteilung in beide Zellkompartimente, Zytoplasma und Zellkern, war allerdings nur in transfizierten Zellen zu beobachten. In nicht-transfizierten Zellen konnte das alpha4-Fragment ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen werden.

Auch bei den Co-Lokalisationsstudien der mit beiden Interaktionspartnern co-transfizierten HeLa-Zellen zeigte eindeutig, dass das alpha4-Fragment sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert war (siehe Abbildung 65 – Abbildung 67).

Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied im Expressionsmuster zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen könnte sein, dass die Zellen durch die Transfektion und der Expression eines Fremdproteins unter Stress stehen. Stress induziert die Proteasom-Maschinerie, um das fremde, überschüssige Protein abzubauen und so aus der Zelle zu entfernen. Die Induktion der Proteasom-Maschinerie hat auch den Nachschub an neuem Proteasom zur Folge, was die Spots (= neue Proteasom-Untereinheiten) in den Zellkernen transfizierter Zellen erklärt.

Das Phänomen, im Zellkern Untereinheiten eines größeren Proteinkomplexes zu finden, findet man auch bei den Ribosomen-Untereinheiten wieder: ribosomale Proteine werden im Zytosol gebildet, in den Kern transportiert und dort mit ribosomaler RNA in Partikel verpackt und als ribosomale Untereinheiten durch die Kernporen wieder aktiv in das Zytosol transportiert. Dabei binden diese Proteine an spezifische Rezeptorproteine in Kernporenkomplex, mit dessen Hilfe sie aktiv durch die Kernporen transportiert werden.

6.5 Technische Aspekte der Größenausschluss-Chromatographie von Parkin und alpha4

Anhand der Methode Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration) konnte die Interaktion von Parkin mit alpha4 nicht nachgewiesen werden.

Bei allen durchgeführten Gelfiltrationsläufen liefen die Proteine zu früh von der Säule und in einem viel zu breiten Fraktionsbereich (siehe 5.6.2).

Eine Erklärung dafür, dass die Proteine zu früh von der Säule liefen und sich in einem sehr breiten Fraktionsbereich befanden, liefert der Punkt, dass die Gelfiltrationsläufe mit Lysaten durchgeführt wurden.

In Lysaten befindet sich eine große Menge an Proteinen, niedermolekularen Substanzen, DNA/RNA etc. Man schätzt, dass jedes Protein Interaktionen mit durchschnittlich drei anderen Proteinen eingeht. Das bedeutet, dass auch Parkin nicht nur mit dem Proteasom interagiert. Auch finden zufällige Zusammenstöße durch Brownsche Bewegung statt, und es gibt viele schwache Interaktionen, die relativ unspezifisch und ohne Bedeutung sind. Solange solche Interaktionen dem Organismus aber keinen Nachteil verschaffen, werden sie ohne Konsequenzen toleriert.

Eine weitere Erklärung, warum die Parkin-Volllängenkonstrukte so früh von der Säule laufen, liefert die Tatsache, dass in Insektenzellen schon natürliches Proteasom vorhanden ist, an das exprimierte Parkin bindet.

Eine Alternative bei der Durchführung dieses Experimentes wäre die Verwendung von gereinigten Proteinen. Allerdings wurde aufgrund folgender Überlegungen darauf auf die Verwendung gereinigter Proteine verzichtet.

Zum einen scheint die Interaktion schwach zu sein (J. C. Dächsel *et al.*, 2005), so dass die Interaktion möglicherweise nicht mehr zustande kommt, wenn sich die Interaktionspartner nicht im natürlichen Umfeld befinden.

Zum anderen war es technisch unrealistisch die beiden Proteine in der benötigten Menge und Stabilität zu produzieren, die den Einsatz der Größenausschluss-Chromatographie mit gereinigten Proteinen ermöglicht hätte.

6.6 Parkin bindet an Untereinheit des 20S-Kernkomplexes des 26S Proteasoms

Die hier erstmals gezeigte Interaktion einer 20S-Untereinheit des 26S Proteasoms (alpha4) mit Parkin, ergänzt neue Literaturangaben, die eine Bindung von Parkin mit Untereinheiten dem 19S-Komplex des Proteasoms beschreiben.

Die Familie der *Ubiquitin-like*-Domänen enthaltenden Proteine (UDPs) umfasst eine konservierte Gruppe von Proteinen, die an einer Vielzahl unterschiedlicher Zellaktivitäten beteiligt sind. Trotz dieser großen Divergenz bzgl. Zellaktivität, deuten neue Studien dieser *Ubiquitin-like*-Domänen enthaltenden Proteine daraufhin, dass sie eine gemeinsame Eigenschaft in Bezug auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit dem 26S Proteasom besitzen. Bevor der Proteinabbau über das 26S Proteasom, dem proteolytischen Hauptabbausystem in eukaryontischen Zellen, beginnt, werden die meisten der zum Abbau bestimmten Proteine markiert, indem eine Kette aus Ubiquitin-Molekülen angehängt wird. Einige *Ubiquitin-like*-Domänen enthaltenden Proteine katalysieren diese Bildung von Ubiquitin-Protein-Konjugaten, während andere mit Chaperonen interagieren und damit bereits ubiquitinierte Proteine für den Abbau markieren. Durch Bindung an das 26S Proteasom scheinen die *Ubiquitin-like*-Domänen enthaltenden Proteine die proteolytischen Grundfunktionen des Partikels zu regulieren, um verschiedene zelluläre Substrate unterzubringen.

(R. Hartmann-Petersen *et al.*, 2004)

Beschrieben wurden solche Interaktionen mit dem 19S regulatorischen Anteil des 26S Proteasoms auch für Parkin, das als E3 Ubiquitin-Ligase ebenfalls eine *Ubiquitin-like*-Domäne besitzt (R. Hartmann-Petersen *et al.*, 2004). Gefunden wurden Interaktionen zwischen Parkin und der Rpn10- (E. Sakata *et al.*, 2003) und der Rpt6-Untereinheit (Y. C. Tsai *et al.*, 2003) des 19S-Kappenkomplexes des 26S Proteasoms. Wie bei den zuvor erwähnten E3 Ubiquitin-Ligasen und *Ubiquitin-like*-Domänen enthaltenden Proteinen wird diese Interaktion ebenfalls über die *Ubiquitin-like*-Domäne von Parkin vermittelt. Parkin besitzt in der *Ubiquitin-like*-Domäne eine Region um Aminosäure Arginin42, an der die Bindung mit der Rpn10-Untereinheit des 19S-Kappenkomplexes des 26S Proteasoms stattfindet (E. Sakata *et al.*, 2003). Auch für die Interaktion mit der Rpt6-Untereinheit des 26S Proteasoms wurde die *Ubiquitin-like*-Domäne von Parkin als Bindungsregion identifiziert (Y. C. Tsai *et al.*, 2003).

Des weiteren wurden Interaktionen von Parkin mit anderen Untereinheiten des 19S regulatorischen Komplexes des 26S Proteasoms beschrieben, wie etwa der Rpn1- oder der Rpn2-Untereinheit (R. Hartmann-Petersen *et al.*, 2004). Dabei wird bis jetzt davon ausgegangen, dass Parkin dabei nicht nur mit dem 19S-Komplex alleine eine Bindung eingeht, sondern dass Parkin, die Rpn1- bzw. Rpn2-Untereinheit des 19S-Komplexes und ein polyubiquitiniertes Substrat transient miteinander interagieren und so eine Plattform bilden könnten, die Proteine so für den Abbau über das 26S Proteasom vorbereitet (R. Hartmann-Petersen *et al.*, 2004). Wie sich bei diesen Studien herausstellte, war es auch hier wieder die *Ubiquitin-like*-Domäne von Parkin, die für die Bindung des 19S-Komplexes des 26S Proteasoms von Bedeutung war.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Parkin auch mit einer Untereinheit des 20S-Kernkomplexes interagiert.

Diese Bindung findet im Gegensatz zu der Bindung mit den Untereinheiten Rpn10, Rpt6 und Rpn1 bzw. Rpn2 nicht mit der amino-terminal lokalisierten *Ubiquitin-like*-Domäne statt, sondern über den C-Terminus von Parkin.

6.6.1 Mögliche Funktion der Interaktion von alpha4 mit Parkin

Im Unterschied zu den meisten anderen Proteinen, die mit Parkin interagieren, wie z.B. CDCrel (Y. Zhang *et al.*, 2000), Synphilin-1 (K. K. Chung *et al.*, 2001), dem Pael-Rezeptor (Y. Imai *et al.*, 2001) oder die O-glykosylierte Form von alpha-Synuclein (Sp22α) (H. Shimura *et al.*, 2001), wird die proteasomale Untereinheit alpha4 nicht in einer Parkin-abhängigen Weise ubiquityliert. Alpha4 ist also kein Substrat von Parkin (J. C. Dächsel *et al.*, 2005), das durch eine Parkin-abhängige Ubiquitylierung für den Abbau über das 26S Proteasom vorbereitet wird.

Wie allgemein für Proteine, die transient mit dem 26S Proteasom assoziiert sind (R. Hartmann-Petersen *et al.*, 2004; E. Sakata *et al.*, 2003) postuliert wird, könnte Parkin nicht nur an der Markierung des abzubauenen Substrates mit einer Ubiquitinkette beteiligt sein, sondern auch die Präsentation des abzubauenen Substrates an das 26S Proteasom vermitteln.

Der genaue Mechanismus dieser Substrat-Präsentation ist gegenwärtig noch unbekannt. Wie andere Proteine mit *Ubiquitin-like*-Domänen, so kann auch Parkin zusätzliche Faktoren der Degradierungsmaschinerie binden. So beschreiben Tsai *et al.* (2003) einen Komplex, der sich

neben Parkin und dem Protein, das abgebaut werden soll, aus dem 26S Proteasom und dem Hitzeschockprotein Hsp70 zusammensetzt. Die Beteiligung von Hsp70 könnte darauf hindeuten, dass Hsp70 hilft, missgefaltete Proteine als Substrate für die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Parkin zu rekrutieren und ihre Präsentation an das 26S Proteasom zu ermöglichen/erleichtern. Hitzeschockproteine sind Proteine, die anderen Proteinen bei der Faltung oder bei der Erhaltung ihrer dreidimensionalen Struktur unter Extrembedingungen helfen. Sie werden dann verstärkt gebildet, wenn die Zelle unter Stress steht (z.B. nach Hitze, Abwehrreaktionen auf plötzliche Milieuveränderungen). In diesen Situationen zellulären Stresses stabilisieren Hitzeschockproteine zelluläre Proteine, um sie vor Denaturierung zu schützen oder sie beschleunigen den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine über das Proteasom.

Im Hinblick auf die neue Interaktion von Parkin mit der alpha4-Untereinheit des 20S-Kernkomplexes der 26S Proteasoms kann darüber spekuliert werden, ob auch der 20S-Kernkomplex eine Rolle in der Parkin-vermittelten Substrat-Präsentation an das 26S Proteasom spielt.

Darüber hinaus könnte Parkin die proteasomale Aktivität durch seine Interaktion mit alpha4 beeinflussen.

Untermauert wird die Hypothese dadurch, dass die Herabregulierung von Parkin über *anti-sense*-Technologie den Abbau des künstlichen Proteasom-Substrates GFP-CL1 verringerte, welches kein Parkin-Substrat ist (L. Petrucelli *et al.*, 2002). Auch die Daten von Dächsel *et al.* (2005), die mit anderen Studien wie denen von Hyun *et al.* (2002) übereinstimmen und zeigen, dass die Überexpression von Parkin die proteasomale Aktivität leicht erhöht, untermauern diese Vermutung.

Die Röntgenstruktur des 20S-Kernkomplexes des Proteasoms der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, bei der der C-Terminus von alpha4 in die Lösung ragt, lässt Hypothesen zu, nach denen alpha4 mit Regulationsfaktoren interagiert (M. Groll *et al.*, 1997). Der N-Terminus von alpha4 ragt in das Lumen des 20S-Kernpartikels des Hefe-Proteasoms und fungiert als eine Art sterische Barriere, dem alpha-Ring, die passiert werden muss, um in zu den in der inneren Kammer gelegenen proteolytisch aktiven Stellen des 20S Kernkomplexes des Proteasomes zu gelangen (A. Köhler *et al.*, 2001).

Auf dem gegenwärtigen Stand der Forschung sind noch keine Zusammenhänge zwischen Parkin-Mutationen und den klinischen oder pathologischen Merkmalen von **A**utosomal-**R**ezessivem **J**uvenilem **P**arkinsonismus (AR-JP), wie etwa der nigralen Degeneration, erklärbar. In der *Substantia Nigra* von Parkinson-Patienten wurde eine herabgesetzte proteasomale Enzymaktivität nachgewiesen (K. S. McNaught *et al.*, 2001). Vermutet wird, dass eine proteasomale Fehlfunktion u.a. einen Anstieg an oxidativen Schäden und Stickoxiden zur Folge hat, wodurch die Zellen aufgrund dieser Sekundäreffekte multicausal (D.-H. Hyun *et al.*, 2002). Die Daten von Hyun *et al.* (2002) zeigen u.a., dass mutiertes Parkin das Ubiquitin-Proteasom-System beeinflusst, und unterstützen die Hypothese, dass eine proteasomale Fehlfunktion ein maßgeblicher Faktor beim neuronalen Zelltod bei den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen ist.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gliederung des menschlichen Gehirns.....	9
Abbildung 2: Die <i>Substantia Nigra</i> im menschlichen Gehirn.....	11
Abbildung 3: Elektronen-mikroskopische Aufnahmen von Lewy-Körperchen.....	15
Abbildung 4: Aminosäuresequenz von Parkin.....	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von Parkin.....	17
Abbildung 6: Das 26S Proteasom.....	19
Abbildung 7: Markierung eines zum Abbau bestimmten Proteins mit einer Ubiquitinkette...	20
Abbildung 8: GATEWAY™ Cloning Technology.....	52
Abbildung 9: Chemische Struktur von Agarose.....	55
Abbildung 10: <i>Spodoptera frugiperda</i> im Erwachsenenstadium.....	61
Abbildung 11: Lebenszyklus des Baculovirus <i>in vitro</i>	63
Abbildung 12: Schematische Darstellung der GST-Affinitätschromatographie.....	69
Abbildung 13: Strukturformel Coomassie Brilliantblue R250.....	74
Abbildung 14: Ungefähre Positionen des <i>Precision Plus Protein</i> ™-Standards von BioRad in Tris-HCl-Polyacrylamid-Gelen verschiedener Acrylamid-Konzentrationen im Trenngel.	78
Abbildung 15: Ungefähre Positionen des <i>Precision Plus Protein</i> ™-Standards von BioRad in Tris-HCl-Polyacrylamid-Gradientengelen verschiedener Acrylamid- Konzentrationsgradienten im Trenngel.....	79
Abbildung 16: Zyklischer Temperaturverlauf einer PCR.....	91
Abbildung 17: Schema einer PCR-Vermehrung.....	92
Abbildung 18: Prinzip und „Fallstricke“ bei der Detektion von Proteinen über Co- Immunpräzipitation.....	105
Abbildung 19: Das Prinzip des Two-Hybrid-Systems.....	108
Abbildung 20: Das Enzym Beta-Galactosidase katalysiert die Umsetzung von farblosem X- Gal zu blauem 5-Brom-4-chlorindigo.....	108
Abbildung 21: Die verschiedenen Parkin-Konstrukte.....	119
Abbildung 22: Die Konstrukte der 20S proteasomalen Untereinheit alpha4.....	120
Abbildung 23: Test der Konstrukte auf Autoaktivierung der Reportergene. (1).....	122
Abbildung 24: Test der Konstrukte auf Autoaktivierung der Reportergene. (2).....	123
Abbildung 25: Ergebnis der Interaktions Mapping-Analyse.....	125
Abbildung 26: Todeskassette <i>rflB</i> nach Gel-Extraktion.....	128
Abbildung 27: Kontrollverdaus der erhaltenen GATEWAY™-kompatiblen Baculo- Expressionsvektoren pAcHLT-D46 und pAcG2T-D47.....	129
Abbildung 28: Amplifikate der genspezifischen PCR.....	132
Abbildung 29: PCR-Produkte der <i>attB</i> -Tail-PCR.....	134
Abbildung 30: Bsr G1-Kontrollverdau der Eingangsklone in Vektor pDONR201.....	135
Abbildung 31: Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pBTM116-D9.....	137
Abbildung 32: Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pDECFP-D11.....	138
Abbildung 33: Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pDEYFP-D12.....	139
Abbildung 34: Kontrollverdau der nach-klonierten Expressionsklone P-418-CT, PSMA7-CT und TF_F2-R318 in Vektor pDEYFP-D12.....	139
Abbildung 35: Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pAcHLT-D46.....	140
Abbildung 36: Pvu I-Verdau der Expressionsklone in Vektor pAcG2T-D47.....	141
Abbildung 37: Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pACT2.....	143
Abbildung 38: Kontrollverdau von PSMA7-CT in Vektor pCMV-Myc und in Vektor pCMV- HA.....	145

Abbildung 39: Optischer Vergleich von nicht-infizierten und mit Baculoviren infizierten Insektenzellen <i>Spodoptera frugiperda</i> Sf9.....	147
Abbildung 40: Coomassie-Gele von aus Sf9-Zelllysaten gereinigten GST-Fusionsproteinen.	150
Abbildung 41: Überprüfung der Expression von PSMA7-CT-D46.....	151
Abbildung 42: Western Blot-Membranen des Pull Down-Experimentes.....	155
Abbildung 43: Chromatogramme der einzelnen Kalibrierungsläufe. (1)	158
Abbildung 44: Chromatogramme der einzelnen Kalibrierungsläufe. (2)	159
Abbildung 45: Kalibrierungskurve der Gelfiltrationssäule HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR.	160
Abbildung 46: Chromatogramm der Co-Expression des Volllängen-Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.	163
Abbildung 47: Western Blot-Analyse des Gelfiltrationslaufs der Co-Expression des Volllängen-Konstruktes des Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.	164
Abbildung 48: Chromatogramm der Co-Expression des N-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4. ...	165
Abbildung 49: Western Blot-Analyse des Gelfiltrationslaufs der Co-Expression des N-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.	166
Abbildung 50: Chromatogramm der Co-Expression des C-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4. ...	167
Abbildung 51: Western Blot-Analyse des Gelfiltrationslaufs der Co-Expression des C-terminalen Fragmentes des Parkin-Wildtyps mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.	168
Abbildung 52: Chromatogramm der Co-Expression des Volllängen-Konstruktes der Parkin-Mutante C418R mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.	169
Abbildung 53: Western Blot-Analyse des Gelfiltrationslaufs der Co-Expression des Volllängen-Konstruktes der Parkin-Mutante C418R mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.....	170
Abbildung 54: Chromatogramm der Co-Expression des C-terminalen Fragmentes der Parkin-Mutante C418R mit dem C-terminalen Fragment der 26S Proteasom-Untereinheit alpha4.	171
Abbildung 55: Western Blot-Analyse des Gelfiltrationslaufs der Co-Expression des carboxy-terminalen fragmentes der Parkin-Mutante C418R mit dem C-terminalen Fragment der 20S Proteasom-Untereinheit alpha4.....	172
Abbildung 56: Lokalisation von Parkin in der Zelle.....	175
Abbildung 57: Lokalisation des carboxy-terminalen alpha4-Fragmentes des 26S Proteasoms in der Zelle.	176
Abbildung 58: Lokalisation von Parkin und Verteilung von Vimentin in der Zelle. (1).....	178
Abbildung 59: Lokalisation von Parkin und Verteilung von Vimentin in der Zelle. (2).....	179
Abbildung 60: Lokalisation von Parkin und Lage des Golgi-Apparates in der Zelle. (1)	181
Abbildung 61: Lokalisation von Parkin und Lage des Golgi-Apparates in der Zelle. (2)	182
Abbildung 62: Co-Lokalisation der exprimierten Parkin-Proteine mit dem in HeLa-Zellen natürlich vorhandenen 26S Proteasom. (1)	185
Abbildung 63: Co-Lokalisation der exprimierten Parkin-Proteine mit dem in HeLa-Zellen natürlich vorhandenen 26S Proteasom. (2)	186
Abbildung 64: Co-Lokalisation der exprimierten Parkin-Proteine mit dem in HeLa-Zellen natürlich vorhandenen 26S Proteasom. (3)	187

Abbildung 65: Co-Lokalisation von Parkin und dem Fragment der 20S proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT). (1).....	190
Abbildung 66: Co-Lokalisation von Parkin und dem Fragment der 20S proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT). (2).....	191
Abbildung 67: Co-Lokalisation von Parkin und dem Fragment der 20S proteasomalen Untereinheit alpha4 (PSMA7-CT). (3).....	192
Abbildung 68: Co-Immunpräzipitation der verschiedenen Parkin-Konstrukte mit dem carboxy-terminalen Fragment der proteasomalen Untereinheit alpha4.	195

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gene und ihre genetische Verknüpfung mit dem Morbus Parkinson.	15
Tabelle 2: Agarose-Konzentrationen für die Auftrennung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten.	55
Tabelle 3: Bekannte Fusionstags und ihre Liganden bzw. Matrices.	68
Tabelle 4: Relative Farbausbeute verschiedener Proteine mit Bradford-Reagenz.	75
Tabelle 5: Zusammenfassung des Reporteraktivitätsassays.	124
Tabelle 6: Bei der genspezifischen PCR verwendete Primerpaare für das jeweilige Konstrukt und Größen der Amplifikate.	131
Tabelle 7: Bei der genspezifischen PCR verwendetes PCR-Programm.	131
Tabelle 8: Bei der <i>attB</i> -Tail-PCR verwendete Primerpaare für das jeweilige Konstrukt und Größen der Amplifikate.	133
Tabelle 9: Bei der <i>attB</i> -Tail-PCR verwendetes PCR-Programm.	133
Tabelle 10: Erwartete Größen beim Kontrollverdau der Eingangsklone in Vektor pDONR201 mit dem Restriktionsenzym Bsr GI.	136
Tabelle 11: Erwartete Größen bei den verschiedenen Kontrollverdaus der Expressionsklone in den unterschiedlichen Expressionsvektoren.	142
Tabelle 12: Erwartete Größen beim Kontrollverdau der Expressionsklone in Vektor pACT2 mit den Restriktionsenzymen Sal I und Not I.	144
Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der Pull Down-Experimente.	154
Tabelle 14: Co-Expressionsansätze für die Gelfiltrationsläufe.	156
Tabelle 15: Anhand der Kalibrierungsläufe erstellte Daten zur Erstellung der Kalibrierungskurve.	160
Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Gelfiltrationsläufe.	161
Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Co-Lokalisationsstudien von Parkin und der alpha4-Untereinheit des natürlichen 26S Proteasoms der Hela-Zellen.	184
Tabelle 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Co-Lokalisationsstudien von Parkin und alpha4.	189
Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationen der verschiedenen Parkin-Konstrukte mit alpha4.	194

9 Literatur

- Abbas, N., Lücking, C. B., Ricard, S., Dürr, A., Bonifati, V., De Michele, G., Bouley, S., Vaughan, J. R., Gasser, T., Marconi, R., Brousolle, E., Brefel-Courbon, C., Harhangi, B. S., Oostra, B. A., Fabrizio, E., Böhme, G. A., Pradier, L., Wood, N. W., Filla, A., Meco, G., Denèfle, P., Agid, Y., Brice, A., the French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. 1999. A wide variety of mutations in the *parkin* gene are responsible for Autosomal Recessive Parkinsonism in Europe. *Human Molecular Genetics* **8**(4):567-574.
- Adams, J. 2002. Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol Med* **8**(4 Suppl):49-54.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. 1995. Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage. VCH-Verlag.
- Alvarez, V., Guisasola, L. M., Moreira, V. G., Lahoz, C. H. and Coto, E. 2001. Early-onset Parkinson's disease associated with a new parkin mutation in Spanish family. *Neuroscience Letters* **313**(1-2):101-110.
- Aravind, L. and Ponting, C. P. 1998. Homologues of the 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci* **7**(5):1250-1254.
- Ardley, H. C., Scott, G. B., Rode, S. A., Tan, N. G. and Robinson, P. A. 2004. UCH-L1 aggresome formation in response to proteasome impairment indicates a role in inclusion formation in Parkinson's disease. *J Neurochem* **90**(2):379-391.
- Ardley, H. C., Tan, N. G., Rose, S. A., Markham, A. F. and Robinson, P. A. 2001. Features of the parkin/ariadne-like ubiquitin ligase, HHARI, that regulate its interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme, Ubch7. *J Biol Chem* **276**(22):19640-19647.
- Ardley, H. C., Scott, G. B., Rose, S. A., Tan, N. G. S., Markham, A. F. and Robinson, P. A. 2003. Inhibition of proteasomal activity causes inclusion formation in neuronal and non-neuronal cells over-expressing parkin. *Mol Biol Cell* **14**(11):4541-4556.
- Asakawa, S., Tsunematsu, K., Takayanagi, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Shintani, A., Kawasaki, K., Mungall, A. J., Beck, S., Minoshima, S. and Shimizu, N. 2001. The genomic structure and promoter region of the human parkin gene. *Biochem Biophys Res Commun* **286**(5):863-868.
- Bandopadhyay, R., de Silva, R., Khan, N., Graham, E., Vaughan, J., Engelender, S., Ross, C. A., Morris, H., Morris, C., Wood, N. W., Daniel, S. and Lees, A. 2001. No pathogenic mutations in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **307**(2):125-127.
- Biasini, E., Fioriti, L., Ceglia, I., Ivernizzi, R., Bertoli, A., Chiesa, R. and Forloni, G. 2004. Proteasome inhibition and aggregation in Parkinson's disease: a comparative study in untransfected and transfected cells. *J Neurochem* **88**(3):545-553.
- Bichet, P., Mollat, P., Capdevila, C. and Sarubbi, E. 2000. Endogenous glutathione-binding proteins of insect cell lines: characterization and removal from glutathione-S-transferase (GST) fusion proteins. *Protein Expr. Purif* **19**(1):197-201.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartman, C. and Huber, R. 1999. The proteasome. *Annu Rev Biochem Biomol Struct* **28**:295-317.
- Bonifati, V., Breedveld, G. J., Squitieri, F., Vanacore, N., Brustenghi, P., Harhangi, B. S., Montagna, P., Cannella, M., Fabbrini, G., Rizzu, P., van Duijn, C. M., Oostra, B. A., Meco, G. and Heutink, P. 2002. Localization of Autosomal-Recessive Early-Onset Parkinsonism to chromosome 1p36 (*PARK7*) in an independent dataset. *Ann Neurol* **51**(2):253-256.

- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.-M., Finley, D. and Schmidt, M.** 1999. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* **1**(4):221-226.
- Brooksbank, C.** 2001. Protein degradation: parkin finds a partner and a victim. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1):4-5.
- Burke, R. E.** 2001. α -synuclein and parkin: coming together of pieces in puzzle of Parkinson's disease. *Lancet* **358**(9293):1567-1568.
- Buselmeier, W.** 1997. Biologie. Sonderausgabe. *Bechtermünz Verlag*.
- Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M. and Cohen, G. M.** 2000. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-Mda apoptosome complexes. *J Biol Chem* **275**(9):6067-6070.
- Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C. and Cohen, G. M.** 1999. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* **274**(32):22686-22692.
- Cesari, R., Martin, E. S., Calin, G. A., Pentimalli, F., Bichi, R., McAdams, H., Trapasso, F., Drusco, A., Shimizu, M., Masciullo, V., d'Andrilli, G., Scambia, G., Piccio, M. C., Alder, H., Godwin, A. K. And Croce, C. M.** 2003. *Parkin*, a gene implicated in Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(10):5956-5961.
- Chau, V., Tobias, J. W., Bachmeier, A., Marriott, D., Ecker, J. D., Gonda, D. K. and Varshavsky, A. A.** 1989. Multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**(4898):1576-1583.
- Choi, P., Ostrerova-Golts, N., Sparkman, D., Cochran, E., Lee, J. M. and Wolozin, B.** 2000. Parkin is metabolized by the ubiquitin/proteasome system. *Neuroreport* **11**(12):2635-2638.
- Chung, K. K. K., Zhang, Y., Lim, K. L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C. A., Dawson, V. L. and Dawson, T. M.** 2001. Parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications in Lewy Body-formation in Parkinson disease. *Nat Med* **7**(10):1144-1150.
- Ciechanover, A.** 2001. Linking ubiquitin, parkin and synphilin-1. *Nat Med* **7**(10):1108-1109.
- Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R. and Hershko, A.** 1981. Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system *Proc. Nati. Acad. Sci.* **78**(2):761-765.
- Compton, S. J. and Jones, C. G.** 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**(2):369-374.
- Corti, O. and Brice, A.** 2001. Parkin and Parkinson's: more than homonymy? *Ann Neurol* **50**(3):283-285.
- Corti, O., Hampe, C., Koutnikova, H., Darios, F., Jacquier, S., Prigent, A., Robinson, J.-C., Pradier, L., Ruberg, M., Mirande, M., Hirsch, E., Rooney, T., Fournier, A. and Brice, A.** 2003. The 38p subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a parkin substrate: linking protein biogenesis to neurodegeneration. *Hum Mol Genet* **12**(12):1427-1437.
- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A. L.** 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**:801-847.
- Cranmer, J. M.** 2001. Parkinson's disease, Environment and genes. *Neurotoxicology* **22**(6):829-832.

- D'Agata, V., Zhao, W., Pascale, A., Zohar, O., Scapagnini, G. and Cavallaro, S. 2002. Distribution of parkin in the adult rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **26**(3):519-527.
- Dächsel, J. C., Lücking, C. B., Deeg, S., Schultz, E., Lalowski, M., Casademut, E., Corti, O., Hampe, C., Patenge, N., Vaupel, K., Yamamoto, A., Dichgans, M., Brice, A., Wanker, E. E., Kahle, P. J. and Gasser, T. 2005. Parkin interacts with the proteasome subunit $\alpha 4$. *FEBS Lett* **579**(18):3913-3919.
- De Silva, H. A. R., Khan, N. L. and Wood, N. W. 2000. The genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Genet Dev* **10**(3):292-298.
- DeStefano, A. L., Lew, M. F., Golbe, L. I., Mark, M. H., Lazzarini, A. M., Guttman, M., Montgomery, E., Waters, C. H., Singer, C., Watts, R. L., Currie, L. J., Wooten, F., Maher, N. E., Wilk, J. B., Sullivan, K. M., Slater, K. M., Saint-Hilaire, M. H., Feldman, R. G., Suchowersky, O., Lafontaine, A.-L., Labelle, N., Growdon, J. H., Vieregge, P., Pramstaller, P. P., Klein, C., Hubble, J. P., Reider, C. R., Stacy, M., MacDonald, M. F., Gusella, J. F. and Myers, R. H. 2002. PARK3 influences age at onset in Parkinson disease: a genome scan in the GenePD study. *Am J Hum Genet* **70**(5):1089-1095.
- Dev, K. K., van der Putten, H., Sommer, B. and Rovelli, G. 2003. Part I: Parkin-associated proteins and Parkinson's disease. *Neuropharmacology* **45**(1):1-13.
- Dong, Z., Ferger, B., Paterna, J.-C., Vogel, D., Furler, S., Osinde, M., Feldon, J. and Büeler, H. 2003. Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(21):12438-12443.
- Eckert, W. A. und Kartenbeck, J. 1996. Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie. Springer-Verlag.
- Enenkel, C., Lehmann, A. and Kloetzel, P.-M. 1998. Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelop-ER network in yeast. *EMBO J* **17**(21):6144-6154.
- Engelender, S., Kaminsky, Z., Guo, X., Sharp, A. H., Amaravi, R. K., Kleiderlein, J. J., Margolis, R. L., Troncoso, J. C., Lanahan, A. A., Worley, P. F., Dawson, V. L., Dawson, T. M. and Ross, C. A. 1999. Synphilin-1 associates with α -synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet* **22**(1):110-114.
- Engelender, S., Wanner, T., Kleiderlein, J. J., Wakabayashi, K., Tsuji, S., Takahashi, H., Ashworth, R., Margolis, R. L. and Ross, C. A. 2000. Organization of the human synphilin-1 gene, a candidate for Parkinson's disease. *Mamm Genome* **11**(9):763-766.
- Faller, A. 1999. Der Körper des Menschen: Einführung in Bau und Funktion. 13. Auflage. Georg Thieme Verlag.
- Fallon, L., Moreau, F., Croft, B. G., Labib, N., Gu, W. J. and Fon, E. A. 2002. Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *J Biol Chem* **277**(1):486-491.
- Farrer, M., Chan, P., Chen, R., Tan, L., Lincoln, S., Hernandez, D., Forno, L., Gwinn-Hardy, K., Petrucelli, L., Hussey, J., Singleton, A., Tanner, C., Hardy, J. and Langston, J. W. 2001. Lewy Bodies and Parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* **50**(3):293-300.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. and Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-
- Finley, D., Ozkaynak, E. and Varshavsky, A. 1987. The yeast ubiquitin gene is essential for resistance to high temperature, starvation, and other stresses. *Cell* **48**(6):1035-1046.

- Fisher, R. D., Wang, B., Alam, S. L., Higginson, D. S., Robinson, H., Sundquist, W. I. and Hill, C. P.** 2003. Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J Biol Chem* **278**(31):28976-28984.
- Forno, L. and Langston, J. W.** 2001. Clinical and neuropathological features: session III summary and research needs. *Neurotoxicology* **22**(6):833-835.
- French, B. A., van Leeuwen, F., Riley, N. E., Yuan, Q. X., Bardag-Gorce, F., Gaal, K., Lue, Y. H., Marceau, N. and French, S. W.** 2001. Aggresome formation in liver cells in response to different toxic mechanisms: role of the ubiquitin-proteasome pathway and the frameshift mutant of ubiquitin. *Exp Mol Pathol* **71**(3):241-246.
- Ganten, D. and Ruckpaul, K.** Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine. *Springer Verlag*. (in press)
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E. J. And Sztul, E. S.** 1999. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* **146**(6):1239-1254.
- Gasser, T.** 2001. Molecular genetics of Parkinson's disease. *Adv Neurol* **86**:23-32.
- Gautreau, A., Fievet, B. T., Brault, E., Antony, C., Houdusse, A., Louvard, D. and Arpin, M.** 2003. Isolation and characterization of an aggresome determinant in the *NF2* tumor suppressor. *J Biol Chem* **278**(8):6235-6242.
- Gavin, A-C. and Superti-Furga, G.** 2003. Protein complexes and proteome organization from yeast to man. *Curr Opin Chem Biol* **7**(1):21-27.
- Gershoni, J. M. and Palade, G. E.** 1982. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal Biochem* **124**(2):396-405.
- Giasson, B. I. and Lee, V. M.-Y.** 2001. Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron* **31**(6):885-888.
- Goehler, H., Lalowski, M., Stelzl, U., Waelter, S., Stroedicke, M., Worm, U., Droege, A., Lindenberg, K. S., Knoblich, M., Haening, C., Herbst, M., Suopanki, J., Scherzinger, E., Abraham, C., Bauer, B., Hasenbank, R., Fritzsche, A., Ludewig, A. H., Buessow, K., Coleman, S. H., Gutekunst, C.-A., Landwehrmeyer, B. G., Lehrach, H. and Wanker, E. E.** 2004. A protein interaction network links GIT1, an enhancer to huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell* **15**(6):853-865. Erratum in: *Mol Cell*. 2005 Jul 22;19(2):287. Buessow, Konrad [corrected to Bussow, Konrad]
- Goldberg, A. L.** 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**(6968):895-899.
- Goldberg, M. S. and Lansbury P. T. Jr.** 2000. Is there a caus-and-effect relationship between α -synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* **2**(7):E115-119.
- Goldberg, M. S., Fleming, S. M., Palacino, J. J., Cepeda, C., Lam, H. A., Bhatnagar, A., Meloni, E. G., Wu, N., Ackerson, L. C., Klapstein, G. J., Gajendiran, M., Roth, B. L., Chesselet, M.-F., Maidment, N. T., Levine, M. S. and Shen, J.** 2003. *Parkin*-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* **278**(44):43628-43635.
- Golemis, E. and Serebriiskii, I.** 2002. A Molecular Cloning Manual: Protein-Protein-Interactions. 1. Auflage. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Greenfield, S. A.** 2003. Reiseführer Gehirn. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. and Huber, R.** 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature* **386**(6624):463-471.

- Gu, W. J., Corti, O., Araujo, F., Hampe, C., Jacquier, S., Lücking, C. B., Abbas, N., Duyckaerts, C., Rooney, T., Pradier, L., Ruberg, M. and Brice, A.** 2003. The 289G and C418R missense mutations cause rapid sequestration of human parkin into insoluble aggregates. *Neurobiol Dis* **14**(3):357-364.
- Haas, A. L. and Siepmann, T. J.** 1997. Pathways of ubiquitin conjugation. *FASEB J* **11**(14):1257-1268.
- Haass, C. and Kahle, P. J.** 2001. Neuroscience.Parkin and its substrates. *Science* **289**(5528):224-225.
- Hartmann-Petersen, R. and Gordon, C.** 2004. Integral UBL domain proteins: a family of proteasome interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol* **15**(2):247-259.
- Hartmann-Petersen, R., Seeger, M. and Gordon, C.** 2003. Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* **28**(1):26-31.
- Hase, A., Yamada, H., Arai, K., Sunada, Y., Shimizu, T. and Matsumura, K.** 2002. Characterization of parkin in bovine peripheral nerve. *Brain res* **930**(1-2):143-149.
- Hasegawa, K., Funayama, M., Matsuura, N., Furusawa, H., Sakai, F., Kowa, F., Kowa, H. and Obata, F.** 2001. Analysis of alpha-synuclein, parkin, tau, and UCH-L1 in Japanese family with autosomal dominant Parkinsonism. *Eur Neurol* **46**(1):20-24.
- Hashimoto, M. and Masliah, E.** 1999. α -synuclein in Lewy Body disease and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **9**(4):707-720.
- Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N. and Nakayama, K.-I.** 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin protein ligases. *J Biol Chem* **276**(35):33111-33120.
- Hattori, N., Matsumine, H., Asakawa, S., Kitada, T., Yoshino, H., Elibol, B., Brookes, A. J., Yamamura, Y., Kobayashi, T., Wang, M., Yoritaka, A., Minoshima, S., Shimizu, N. and Mizuno, Y.** 1998. Point mutations (Thr240Arg and Gln 311Stop) in the *parkin* gene. *Biochemical and Biophysical Research communications* **249**(3):754-758.
- Hegde, A. N. and DiAntonio, A.** 2002. Ubiquitin and the synapse. *Nature* **3**(11):854-861.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L. and Rose, I. A.** 1980. Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci* **77**(4): 1783-1786.
- Hilker, R., Klein, C., Hedrich, K., Ozelius, L. J., Vieregge, P., Herholz, K., Pramstaller, P. P. and Heiss, W.-D.** 2002. The striatal dopaminergic deficit is dependent on the number of mutant alleles in a family with mutations in the *parkin* gene: evidence for enzymatic parkin function in humans. *Neurosci Lett* **323**(1):50-54.
- Holowaty, M. N., Sheng, Y., Nguyen, T., Arrowsmith, C. and Fraoier, L.** 2003. Protein interaction domains of the ubiquitin-specific protease, USP7/HAUSP. *J Biol Chem* **278**(48):47753-47761.
- Horowitz, J. M., Vernace, V. A., Myers, J., Stachowiak, M. K., Hanlon, D. W., Fraley, G. S. and Torres, G.** 2001. Immunodetection of parkin protein in vertebrate and invertebrate brains: a comparative study using specific antibodies. *J Chem Neu* **21**(1):75-93.
- Huynh, D. P., Scoles, D. R., Ho, T. H., Del Bigio, M. R. and Pulst, S. M.** 2000. Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells. *Ann Neurol* **48**(5):737-744.
- Huynh, D. P., Scoles, D. R., Nguyen, D. and Pulst, S. M.** 2003. The Autosomal Recessive Juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptogamin XI. *Hum Mol Genet* **12**(20):2587-2597.

- Hyun, D.-H., Lee, M.H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Halliwell, B. and Jenner, P.** 2002. Effect of wild-type or mutant parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J Biol Chem* **277**(32):28572-28577.
- Imai, Y., Soada, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K. I. and Takahashi, R.** CHIP is associated with parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* **10**(1):55-67.
- Imai, Y., Soda, M. and Takahashi, R.** 2000. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* **275**(46):35661-35664.
- Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. and Takahashi, R.** 2001. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of parkin. *Cell* **105**(7):891-902.
- Jacobson, G. and Karsnäs, P.** 1990. Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer. *Electrophoresis* **11**(1):46-52.
- Jiang, H., Ren, Y., Zhao, J. and Feng, J.** 2004. Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* **13**(16):1745-1754.
- Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R.** 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**(7):1883-1898.
- Joseph D. Etlinger and Alfred L. Goldberg.** 1977. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**(1):54-5.
- Kahle, P. J. and Haass, C.** 2004. How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson's disease? *EMBO Rep* **5**(7):681-685.
- Kahle, P. J., Leimer U. and Haass, C.** 2000. Does failure of parkin-mediated ubiquitination cause juvenile Parkinsonism? *Trends Biochem Sci* **25**(11):524-527.
- Kahns, S., Kalai, M., Jakobsen, L. D., Clark, B. F. C., Vandenabeele, P. and Jensen, P. H.** 2003. Caspase-1 and Caspase-8 cleave and inactivate cellular parkin. *J Biol Chem* **278**(26):23376-23380.
- Kahns, S., Lykkebo, S., Jakobsen, L. D., Nielsen, M. S. and Jensen, P. H.** 2002. Caspase-mediated parkin cleavage in apoptotic cell death. *J Biol Chem* **18**(3):15303-15308.
- Kann, M., Jacobs, H., Mohrmann, K., Schumacher, K., Hedrich, K., Garrels, J., Wieggers, K., Schwinger, E., Pramstaller, P. P., Breakefield, X. O., Ozelius, L. J., Vieregge, P. and Klein, C.** 2002. Role of Parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset Parkinsonism. *Ann Neurol* **51**(5):621-625.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M. Ito, A. and Yao, T.-P.** 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* **115**(6):727-738.
- Kawamata, H., McLean, P. J., Sharma, N. and Hyman, B. T.** 2001. Interaction of α -synuclein and synphilin-1: effect of Parkinson's disease-associated mutations. *J Neurochem* **77**(3):929-934.
- King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M. and Kirschner, M. W.** 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**(5293):1652-1659.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. And Shimizu, N.** 1998. Mutations in the parkin gene cause Autosomal Juvenile Parkinsonism. *Nature* **392**(6676):544-545.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. And Shimizu, N.** 1998. Mutations in the *parkin* gene caus Autosomal ressecrive Juvenile Parkinsonism. *Nature* **392**(6676):605-608.

- Kitada, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Mizuno, Y. And Shimizu, N.** 2000. Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. *Mamalian Genome* **11**(6):417-421.
- Klein, C., Hedrich, K., Wellenbrock, C., Kann, M., Harris, J., Marder, K., Lang, A. E., Schwinger, E., Ozelius, L. J., Vieregge, P., Pramstaller, P. P. and Kramer, P. L.** 2003. Frequency of parkin mutations in late-onset Parkinson`s disease. *Ann Neurol* **54**(3):415-417.
- Klein, C., Pramstaller, P. P., Kis, B., Page, C. C., Kann, M., Leung, J., Woodward, H., Castellan, C. C., Scherer, M., Vieregge, P., Breakefield, X. O., Kramer, P. L. and Ozelius, L. J.** 2000. *Parkin* deletions in a family with adult-onset, tremor.dominant Parkinsonism: expanding the phenotype. *Ann Neurol* **48**(1):65-71.
- Köhler, A., Bajorek, M., Groll, M., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H. and Finley, D.** 2001. The substrate translocation channel of the proteasome. *Biochimie* **83**(3-4):325-332.
- Kopito, R. R.** 2000. Aggresome, inclusion bodies and protein degradation. *Trends Cell Biol* **10**(12):524-530.
- Kösel, S., Hofhaus, G., Maassen, A, Vieregge, P. and Graeber, M. B.** 1999. Role of mitochondria in Parkinson`s disease. *Biol Chem* **380**(7-8):865-870.
- Krüger, R., Eberhardt, O., Riess, O. and Schulz, J. B.** 2002. Parkinson`s disease: one biochemical pathway to fit all genes? *Trends Mol Med* **8**(5):236-240.
- Krüger, R., Vieira-Saecker, A. M. M., Kuhn, W., Berg, D., Müller, T., Kühnl, N., Fuchs, G. A., Storch, A., Hungs, M., Woitalla, D., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schöls, L. and Riess, O.** 1999. Increased susceptibility to sporadic Parkinson`s disease by a certain combined α -synuclein/Apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* **45**(5):611-617.
- Kubo S., Kitami, T., Shimura, H., Uchiyama, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Mizuno, Y. and Hattori, N.** 2001. Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem* **78**(1):42-54.
- Lansbury, P. T. Jr. and Brice, A.** 2002. Genetics of Parkinson`s disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr Opin Genet Dev* **12**(3):299-306.
- Larsen, C. N. and Finley, D.** 1997. Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* **91**(4):431-434.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Anderson, K. C. and Glimcher, L. H.** 2003. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response im myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(17):9946-9951.
- Lee, D. H. and Goldberg, A. L.** 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**(10):397-403.
- Lelouard, H., Ferrand, V., Marguet, D., Bania, J., Camosseto, V., David, A., Gatti, E. and Pierre, P.** 2004. Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J Cell Biol* **164**(5):667-675.
- Lindersson, E., Beedholm, R., Højrup, P., Moos, T., Gai, W.-P., Hendil, K. B. and Jensen, P. H.** 2004. Proteasomal inhibition by α -synuclein filaments and oligomers. *J Biol Chem* **279**(13):12924-12934.
- Lohmann, E., Periquet, M., Bonifati, V., Wood, N. W., De Michele, G., Bonnet, A.-M., Fraix, V., Broussolle, E., Horstink, M. W. I. M., Vidaihet, M., Verpillat, P., Gasser, T., Nicholl, D., Teive, H., Raskin, S., Rascol, O., Destée, A., Ruberg, M., Gasparini, F., Meco, G., Agid, Y., Dürr, A., Brice, A., the French Parkinson`s Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson`s Disease.** 2003. How much phenotypic variation can be attributed to *parkin* genotype? *Ann Neurol* **54**(2):176-185.

- Lotharius, J. and Brundin, P.** 2002. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nat Rev Neurosci* **3**(12):932-942.
- Lozano, A. M., Lang, A. E., Hutchison, W. D. and Dostrovsky, J. O.** 1998. New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and its treatment. *Curr Opin Neurobiol* **8**(6):783-790.
- Lücking, C. B. and Brice, A.** 2000. α -synuclein and Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* **57**(13-14):1894-1908.
- Lücking, C. B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B. S., Meco, G., Denèfle, P., Wood, N. W., Agid, Y. and Brice, A.** 2000. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations on the *parkin* gene. *N Engl J Med* **342**(21):1560-1567.
- Martinez-Noel, G., Müller, U. and Harbers, K.** 2001. Identification of molecular determinants required for interaction of ubiquitin-conjugating enzymes and RING finger proteins. *Eur J Biochem* **268**(22):5912-5919.
- Maruyama, M., Ikeuchi, T., Saito, M., Ishikawa, A., Yuasa, T., Tanaka, H., Hayashi, S., Wakabayashi, K., Takahashi, H. and Tsuji, S.** 2000. Novel mutations, pseudodominant inheritance, and possible familial affects in patients with Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism. *Ann Neurol* **48**(2):245-250.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K. and Fukamizu, A.** 2003. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(20):11285-11290.
- McNaught, K. S., Mytilineou, C., Jnoubatiste, R., Yabut, J., Shashidharan, P., Jeennert, P. and Olanow, C. W.** 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J Neurochem* **81**(2):301-306.
- McNaught, K. S., Shashidharan, P., Perl, D. P., Jenner, P. and Olanow, C. W.** 2002. Aggresome-related biogenesis of Lewy Bodies. *Eur J Neurosci* **16**(11):2136-2148.
- McNaught, K. S., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P. and Olanow, C. W.** 2003. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol* **179**(1):38-46.
- Mitch W. E. and Goldberg, A. L.** 1996. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin proteasome pathway. *N Engl J Med* **335**(25):1897-1905.
- Mizuno, Y., Hattori, N. and Mori, H.** 1999. Genetics of Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* **53**(3):109-116.
- Mizuno, Y., Hattori, N., Kitada, T., Matsumine, H., Mori, H., Shimura, H., Kubo, S., Kobayashi, H., Asakawa, S., Minoshima, S. and Shimizu, N.** 2001. Familial Parkinson's disease: alpha-synuclein and parkin. *Adv Neurol* **86**:13-21.
- Mizuno, Y., Hattori, N., Mori, H., Suzuki, T. and Tanaka, K.** 2001. Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* **14**(4):477-482.
- Mühlhardt, C.** 2003. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 4. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**:263-273.
- Muñoz, E., Pastor, P., Martí, M. J., Oliva, R. and Tolosa, E.** 2000. A new mutation in the parkin gene in a patient with atypical Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism. *Neuroscience Letters* **289**(1):66-68.

- Muqit, M. M. K., Davidson, S. M., Payne Smith, M. D., MacCormac, L. P., Kahns, S., Jensen, P. H., Wood, N. W. and Latchman, D. S.** 2004. Parkin is recruited into aggresomes in a stress-specific manner: over-expression of parkin reduces aggresome formation but can be dissociated from parkin's effect on neuronal survival. *Hum Mol Genet* **13**(1):117-135.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. and Tanaka, K.** 2001. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded proteins. *EMBO Rep* **2**(12):1133-1138.
- Nakahara, T., Gotoh, L., Motomura, K., Kawanami, N., Ohta, E., Hirano, M. and Uchimura, H.** 2001. Acute and chronic haloperidol treatments increase parkin mRNA levels in the rat brain. *Neuroscience Letters* **306**(1-2):93-96.
- Neystat, M., Rzhetskaya, M., Kholodilov, N. and Burke, R. E.** 2002. Analysis of synphilin-1 and dynuclein interactions by yeast two-hybrid β -galactosidase liquid assay. *Neurosci Lett* **325**(2):119-123.
- Norris, E. H., Giasson, B. I., Ischiropoulos, H. and Lee, V. M.-Y.** 2003. Effects of oxidative and nitrative challenges on α -synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications. *J Biol Chem* **278**(29):27230-27240.
- Pankratz, N., Nichols, W. C., Uniacke, S. K., Halter, C., Murrell, J., Rudolph, A., Shults, C. W., Conneally, P.M., Foroud, T. and the Parkinson Study Group.** 2003. Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson's disease families. *Hum Mol Genet* **12**(20):2599-2608.
- Passmore, L. A. and Barford, D.** Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J* **379**(Pt 3):513-525.
- Peng, X.-R., Jia, Z., Zhang, Y., Ware, J. and Trimble, W. S.** 2002. The septin CDCrel-1 is dispensable for normal development and neurotransmitter release. *Mol Cell Biol* **22**(1):378-387.
- Periquet, M., Lücking, C. B., Vaughan, J. R., Bonifati, V., Dürr, A., De Michele, G., Horstink, M. W. I. M., Farrer, M., Illarioshkin, S. N., Pollak, P., Borg, M., Brefel-Courbon, C., Denèfle, P., Meco, G., Gasser, T., Breteler, M. M. B., Wood, N. W., Agid, Y., Brice, A., the French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease.** 2001. Origin of the mutations in the *parkin* gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from founder effects. *Am J Hum Genet* **68**(3):617-626.
- Peters, J.-M., Franke, W. W. and Kleinschmidt, J. A.** Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* **269**(10):7709-7718.
- Petrucelli, L., O'Farrell, C., Lockhart, P. J., Baptista, M., Kehoe, K., Vink, L., Choi, P., Wolozin, B., Farrer, m., Hardy, J. and Cookson, M. R.** 2002. Parkin protects against the toxicity associated with mutant α -synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* **36**(6):1007-1019.
- Pineda-Trujillo, N., Carvajal-Carmona, L. G., Buriticá, O., Moreno, S., Uribe, C., Pineda, D., Toro, M., García, F., Arias, W., Bedoya, G., Lopera, F. and Ruiz-Linares, A.** 2001. A novel Cys212Tyr founder mutation in *parkin* and allelic heterogeneity of juvenile Parkinsonism in a population from North West Columbia. *Neuroscience Letters* **298**(2):87-90.
- Rankin, C. A., Joazeiro, C. A., Floor, E. and Hunter, T.** 2001. E3 ubiquitin-protein ligase activity of parkin is dependent on cooperative interaction of RING finger (TRIAD) elements. *J Biomed Sci* **8**(5):421-429.
- Read, S.M. and Northcote, D. H.** 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem* **116**:53-64.
- Rehm, H.** 2002. Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 4.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.

- Reusch, R. N., Hiske, T. W. and Sadoff, H. L.** 1986. Poly-beta-hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformability in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **168**(2):553-562.
- Ribeiro, C. S., Carneiro, K., Ross, C. A., Menezes, J. R. L. and Engelender, S.** 2002. Synphilin-a is developmentally localized to synaptic terminals, and its association with synaptic vesicles is modulated by α -synuclein. *J Biol Chem* **277**(26):23927-23933.
- Riess, O., Jakes, R. and Krüger, R.** 1998. Genetic dissection of familial Parkinson's disease. *Mol Med Today* **4**(10):438-444.
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. and Goldberg, A. L.** 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**(5):761-771.
- Rolfe, M., Chiu, M. I. and Pagano, M.** 1997. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. *J Mol Med* **75**(1):5-17.
- Saito, M., Maruyama, M., Ikeuchi, K., Kondo, H., Ishikawa, A., Yuasa, T. and Tsuji, S.** 2000. Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism. *Brain Dev* **22** Suppl 1:S115-117.
- Sakata, E., Yamaguchi, Y., Kurimoto, E., Kikuchi, J., Yokoyama, S., Yamada, S., Kawahara, H., Zokosawa, H., Hattori, N., Miyuno, Z., Tanaka, K. and Kato, K.** 2003. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin/like domain. *EMBO Rep* **4**(3):301-306.
- Salinovic, O. und Montelaro, R. C.** (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis. *Anal Biochem* **156**:341-347.
- Salwinski, L. and Eisenberg, D.** 2003. Computational methods of analysis of protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* **13**(3):377-382.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1998. Molecular Cloning. 2. Auflage. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.
- Schägger, H. und Jagow, G.V.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analyt Biochem* **166**:368-379.
- Schlossmacher, M. G., Frosch, M. P., Gai, W.P., Medina, M., Sharma, N., Forno, L., Ochiishi, T., Shimura, H., Sharon, R., Hattori, N., Langston, J. W., Mizuno, Y., Hyman, B. T., Selkoe, D. J. and Kosik, K. S.** 2002. Parkin localizes to the Lewy Bodies of Parkinson disease and Dementia with Lewy Bodies. *J Pathol* **160**(5):1655-1667.
- Schnell, J. D. and Hicke, L.** 2003. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **278**(38):35857-35860.
- Schöls, L., Krüger, R. und Przuntek, H.** 2001. Parkinsongenetik: Schutz und Vorsorge im Blick. *MEDrubin* **2001**:30-33.
- Schwikowski, B., Uetz, P. and Fields, S.** 2000. A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat Biotechnol* **18**(12):1257-1261.
- Scott, W. K., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Koller, W. C., Lyons, K., Pahwa, R., Sten, M. B., Colcher, A., Hiner, B. C., Jankovic, J., Ondo, W. G., Allen, F. H. Jr., Goetz, C. G., Small, G. W., Masterman, D., Mastaglia, F., Laing, N. G., Stajich, J. M., Slotterbeck, B., Booze, M. W., Ribble, R. C., Rampersaud, E., West, S. G., Gibson, R. A., Middleton, L. T., Roses, A. D., Haines, J. L., Scott, B. L., Vance, J. M. and Pericak-Vance, M. A.** 2001. Complete genomic screen in Parkinson's disease. Evidence for multiple genes. *JAMA* **286**(18):2239-2244.
- Seyffert, W., Gassen, H. G., Hess, O., Jäckle, H. und Fischbach, K.-F.** 1998. Lehrbuch der Genetik. *Gustav Fischer Verlag*.

- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. and Suzuki, T.** 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* **25**(3):302-305.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Yoshikawa, M., Kitada, T., Matsumine, H., Asakawa, S., Minoshima, S., Yamamura, Y., Shimizu, N. and Mizuno, Y.** 1999. Immunohistochemical and subcellular localization of parkin protein: absence of protein in Autosomal Juvenile Parkinsonism patients. *Ann Neurol* **45**(5):668-672.
- Shimura, H., Schlossmacher, M. G., Hattori, N., Frosch, M. P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K. S. and Selkoe, D. J.** 2001. Ubiquitination of a new form of α -synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* **293**(5528):263-269.
- Shoulson, I., Oakes, D., Fahn, S., Lang, A., Langston, W., LeWitt, P., Olanow, C. W., Penney, J. B., Tanner, C., Kieburtz, K., Rudolph, A. and tehn Parkinson Study Group.** 2002. Impact of sustaines Deprenyl (Selegiline) Levodopa-treated Parkinson's disease: a randomized placebo-controlled extension of the deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of Parkinsonism trial. *Ann Neurol* **51**(5):604-612.
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Muentner, M., Bapista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J. and Gwinn-Hardy, K.** 2003. α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **302**(5646):841.
- Smith P. D., Crocker, S. J., Jackson-Lewis, V., Jordan-Sciutto, K. L., Hayley, S., Mount, M. P., O'Hare, M. J., Callaghan, S., Slack, R. S., Przedborski, S., Anisman, H. and Park, D. S.** 2003. Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(23):13650-13655.
- Solano, S. M., Miller, D. W., Augood, S. J., Young, A. B. and Penney, J. B. Jr.** 2000. Expression of alpha-synuclein, parkin, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 mRNA in human brain: genes associated with familial Parkinson's disease. *Ann Neurol* **47**(2):201-210.
- Sommer, T. and Jentsch, S.** 1993. A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmatic reticulum. *Nature* **365**:176-179.
- Spillantini, M. G. and Goedert, M.** 2001. Tau and Parkinson's disease. *JAMA* **286**(18):2324-1236.
- Staropoli, J. F., McDermott, C., Martinat, C., Schulmann, B., Demireva, E. and Abeliovich, A.** 2003. Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainite excitotoxicity. *Neuron* **37**(5):735-749.
- Sunada, Y., Saito, F., Matsumura, K. And Shimizu, T.** 1998. Differential expression of the parkin gene in the human brain and peripheral leukocytes. *Neurosci Lett* **254**(3):180-182.
- Tanaka, K., Suzuki, T. and Chiba, T.** 1998. The ligation systems for ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Mol Cells* **8**(5):503-512.
- Tanaka, K., Suzuki, T., Chiba, T., Shimura, H., Hattori, N. and Mizuno, Y.** 2001. Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *J Mol Med* **79**(9):482-494.
- Tanaka, K., Waxman, L., and Goldberg, A.** 1984. Vanadate inhibits the ATP-dependent degradation of proteins in reticulocytes without affecting ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* **259**:2803-280
- Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R. K., Wanner, T., Tanzi, R. E., Sawa, A., Dawson, V. L., Dawson, T. M. and Ross, C. A.** 2001. Inducible expression of mutant α -synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* **10**(9):919-926.

- Tayebi, N., Callahan, M., Madike, V., Stubblefield, B. K., Orvisky, E., Krasnewich, D., Fillano, J. J. and Sidransky, E.** 2001. Gaucher disease and Parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. *Mol Genet Metab* **73**(4):313-321.
- Tsai Y. C., Fishman, P. S., Thakor, N. V. and Oyler, G. A.** 2003. Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J Biol Chem* **278**(24):22044-22055.
- Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N. and Tsukihara, T.** 2002. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure (Camb)* **10**(5):609-618.
- Valente, E. M., Bentivoglio, A. R., Dixon, P. H., Ferraris, A., Ialongo, T., Frontali, M., Albanese, A. and Wood, N. W.** 2001. Localization of a novel locus for Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* **68**(4):895-900.
- Valente, E. M., Brancati, F., Ferraris, A., Graham, E. A., Davis, M. B., Breteler, M. M. B., Gasser, T., Bonifati, V., Bentivoglio, A. R., De Michele, G., Dürr, A., Cortelli, P., Wassilowsky, D., Harhangi, B. S., Rawal, N., Caputo, V., Filla, A., Meo, G., Oostra, B. A., Brice, A., Albanese, A., Dallapiccola, B., Wood, N. W., FRCP and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease.** 2002. PARK6-linked Parkinsonism occurs in several European families. *Ann Neurol* **51**(1):14-18.
- Van Duijn, C. M., Dekker, C. J., Bonifati, V., Galjaard, R. J., Houwing-Duistermaat, J. J., Snijders, P. J. L. M., Testers, L., Breedveld, G. J., Horstink, M., Sandkuyl, L. A., van Swieten, J. C., Oostra, B. A. and Heutink, P.** 2001. PARK7, a novel locus for Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* **69**(3):629-634.
- Vaughan, J. R., Davis, M. B. and Wood, N. W.** 2001. Genetics of Parkinsonism: a review. *Ann Hum Genet* **65**(Pt 2):111-126.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. and McCawler, P.** 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *In Vitro* **13**(4):213-217.
- Verma, R. and Deshaies, R. J.** 2000. A proteasome holoenzyme: the case of the missing signal. *Cell* **101**(4):341-344.
- Vila, M. and Przedborski, S.** 2004. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* **10** Suppl:S58-62.
- Von Brandis, H.-J. und Schönberger, W.** 1991. Anatomie und Physiologie für Krankenschwestern sowie andere medizinische und pharmazeutische Fachberufe. 8. Auflage. *Gustav Fischer Verlag*.
- Von Coelln, R., Dawson, V. L. and Dawson, T. M.** 2004. Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* **318**(1):175-184.
- Waelter, S., Boeddrich, A., Lurz, R., Scherzinger, E., Lueder, G., Lehrach, H. and Wanker, E. E.** 2001. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* **12**(5):1393-1407.
- Wakabayashi, K., Engelender, S., Tanaka, Y., Yoshimoto, M., Mori, F., Tsuji, S., Ross, C. A. and Takahashi, H.** 2002. Immunocytochemical localization of synphilin-1, a α -synuclein-associated protein, in neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol (Berl)* **103**(3):209-214.
- Wakabayashi, K., Engelender, S., Yoshimoto, M., Tsuji, S., Ross, C. A. and Takahashi, H.** 2000. Synphilin-1 is present in Lewy Bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **47**(4):521-523.
- Wang, M., Hattori, N., Matsumine, H., Kobayashi, T., Yoshino, H., Morioka, A., Kitada, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N. and Mizuno, Y.** 1999. Polymorphism in the *parkin* gene in sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol* **45**(5):655-658.

- Wang, M., Suzuki, T., Kitada, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Tanaka, K., Mizuno, Y. and Hattori, N.** 2001. Developmental changes in the expression of parkin and UbcR7, a parkin-interacting and ubiquitin-conjugating enzyme, in rat brain. *J Neurochem* **77**(6):1561-1568.
- Webster, J. M., Tiwari S., Weissman, A. M. and Wojcikiewicz, R. J. H.** 2003. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor ubiquitination is mediated by mammalian Ubc7, a component of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway, and is inhibited by chelation of intracellular Zn^{2+} . *J Biol Chem* **278**(40):38238-38246.
- Welsch, C. A., Hagiwara, S., Goetschy, J. F. and Movva, N. R.** 2003. Ubiquitin pathway proteins influence the mechanism of action of the novel immunosuppressive drug FTY720 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**(29):26976-26982.
- West, A., Farrer, M., Petrucelli, L., Cookson, M., Lockhart, P. and Hardy, J.** 2001. Identification and characterization of the human parkin gene promoter. *J Neurochem* **78**(5):1146-1152.
- West, A., Periquet, M., Lincoln, S., Lücking, C. B., Nicholl, D., Bonifati, V., Rawal, N., Gasser, T., Lohmann, E., Deleuze, J.-F., Maraganore, D., Levey, A., Wood, A., Dürr, A., Hardy, J., Brice, A., Farrer, M., the French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease.** 2002. Complex relationship between parkin mutations and Parkinson's disease. *Am J Hum Genet* **114**(5):584-591.
- Whitby, F. G., Masters, E. I., Kramer, L., Knowlton, J. R., Yao, Y., Wang, C. and Hill, C. P.** 2000. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**(6808):115-20.
- Wigley, W. C., Fabunmi, R. P., Lee, M. G., Marino, C. R., Muallem, S., DeMartino, G. N. and Thomas, P. J.** 1999. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol* **145**(3):481-490.
- Wilkinson, K. D., Urban, M. K. and Haas, A. L.** 1980. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **255**(16):7529-7532.
- Wink, M.** 2004. Molekulare Biotechnologie. 1. Auflage. Wiley-VCH.
- Yamamoto, A., Friedlein, A., Imai, Y., Takahashi, R., Kahle, P. J. and Haass, C.** 2005. Parkin phosphorylation and modulation of its E3 ubiquitin ligase activity. *J Biol Chem* **280**(5):3390-3399.
- Yamamura, Y., Hattori, N., Matsumine, H., Kuzuhara, S. and Mizuno, Y.** 2000. Autosomal recessive early-onset Parkinsonism with diurnal fluctuation: clinicopathologic characteristics and molecular genetic identification. *Brain Dev* **22** Suppl 1:S87-91.
- Yen, H.-C. S., Espiritu, C. and Chang, E. C.** 2003. Rpn5 is a conserved proteasome subunit and required for proper proteasome localization and assembly. *J Biol Chem* **278**(33):30669-30676.
- Yokochi, M.** 2000. Development of the nosological analysis of juvenile Parkinsonism. *Brain Dev* **22** Suppl 1:S81-86.
- York, I. A. and Rock, K. L.** 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* **14**:369-396.
- Zhang, Y., Gao, J., Chung, K. K., Huang, H., Dawson, V. L. and Dawson, T. M.** 2000. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(24):13354-13359.
- Zhang, Z., Torii, N., Furusaka, A., Malayaman, N., Hu, Z. and Liang, T. J.** 2000. Structural and functional characterization of interaction between Hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* **275**(20):15157-15165.
- Zhao, J., Ren, Y., Jiang, Q. and Feng, J.** 2003. Parkin is recruited to the centrosome in response to inhibition of proteasomes. *J Cell Sci* **116**(Pt 19):4011-4019.

10 Anhang

10.1 PCR-Programme

PCR-Programm „55-30“			
Schritt		Temperatur	Dauer
1	Anfangs-Denaturierung	95°C	1 min
2	Denaturierung	95°C	30 sec
3	Primer-Anlagerung	55°C	30 sec
4	Primer-Verlängerung	72°C	2 min
5	Zyklenzahl	goto 2	29 x
6	Abschluß-Verlängerung	72°C	7 min
7		4°C	forever

Programm für genspezifische GATEWAY-PCR

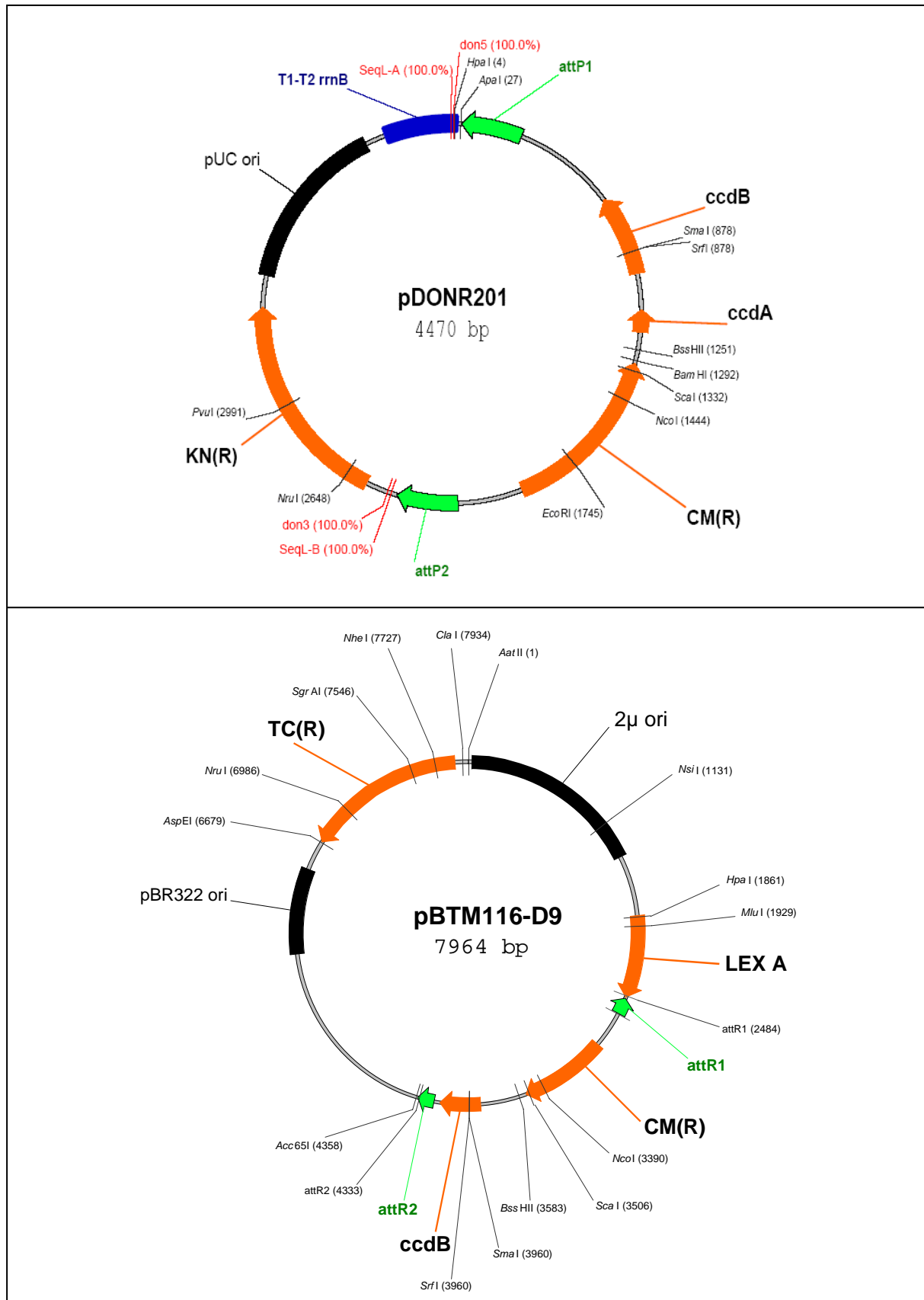
PCR-Programm „Tail40“			
Schritt		Temperatur	Dauer
1	Anfangs-Denaturierung	95°C	1 min
2	Denaturierung	95°C	30 sec
3	Primer-Anlagerung	40°C	20 sec
4	Primer-Verlängerung	72°C	2 min
5	Zyklenzahl	goto 2	5 x
6	Denaturierung	95°C	30 sec
7	Primer-Verlängerung	72°C	2 min
8	Zyklenzahl	goto 6	12 x
9	Abschluß-Verlängerung	72°C	10 min
10		4°C	forever

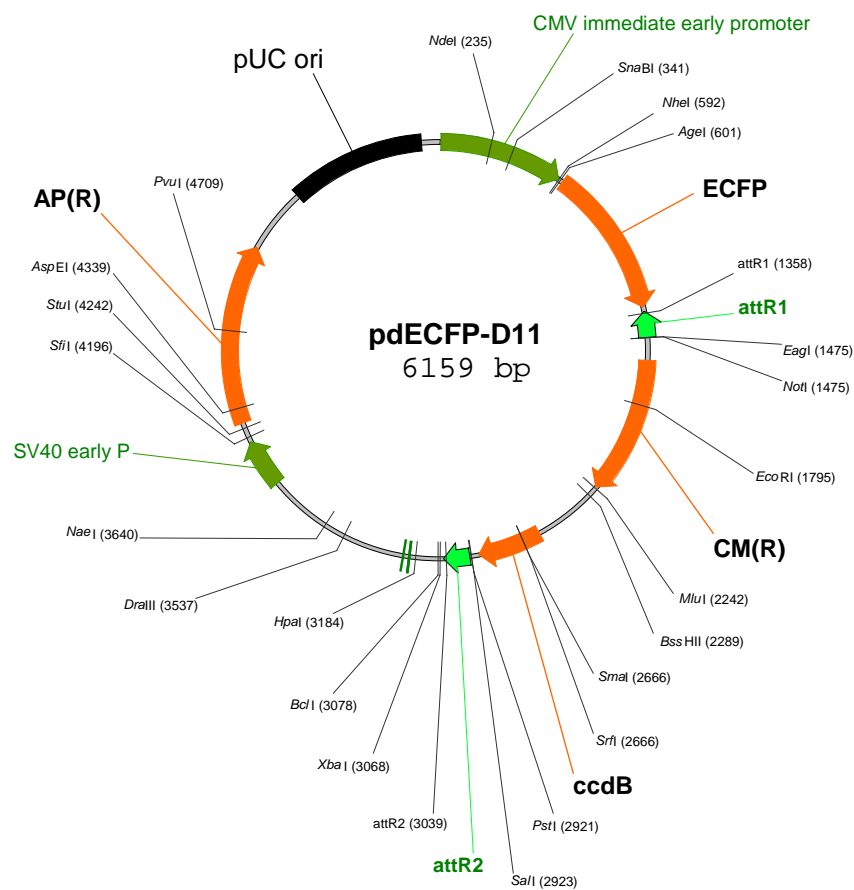
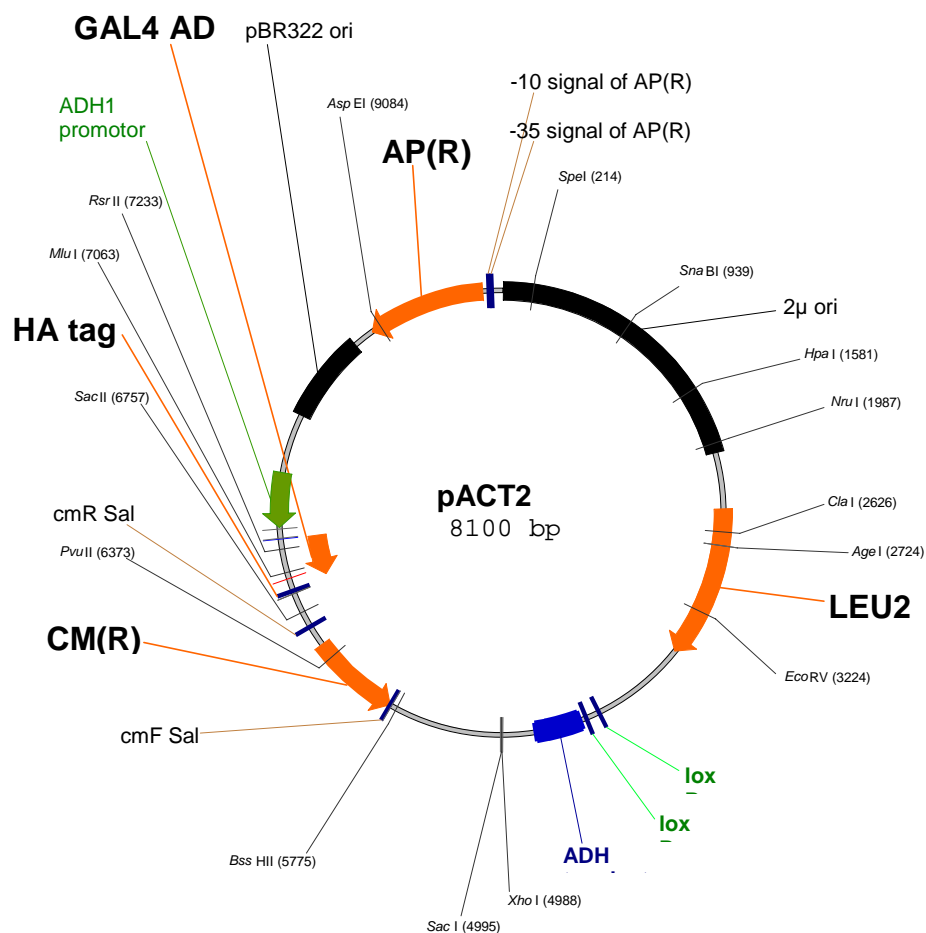
Programm für attB-Tail-PCR

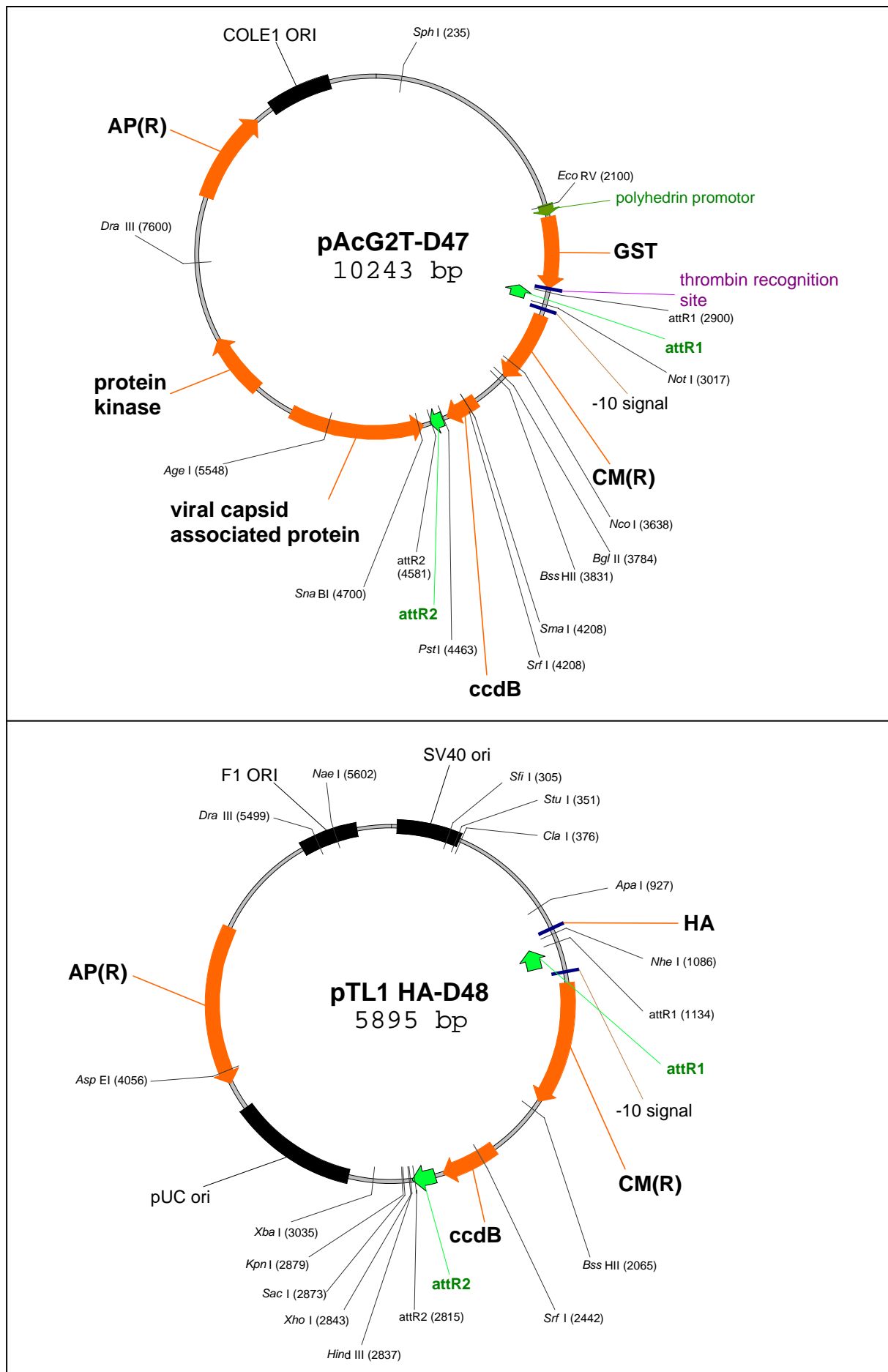
PCR-Programm „Myco“			
Schritt		Temperatur	Dauer
1	Anfangs-Denaturierung	94°C	2 min
2	Denaturierung	55°C	2 min
3	Primer-Anlagerung	72°C	2 min
4	Primer-Verlängerung	94°C	30 sec
5	Zyklenzahl	55°C	1 min
6	Denaturierung	72°C	1 min
7	Primer-Verlängerung	goto 4	34 x
8	Zyklenzahl	72°C	4 min
9	Abschluß-Verlängerung	4°C	forever

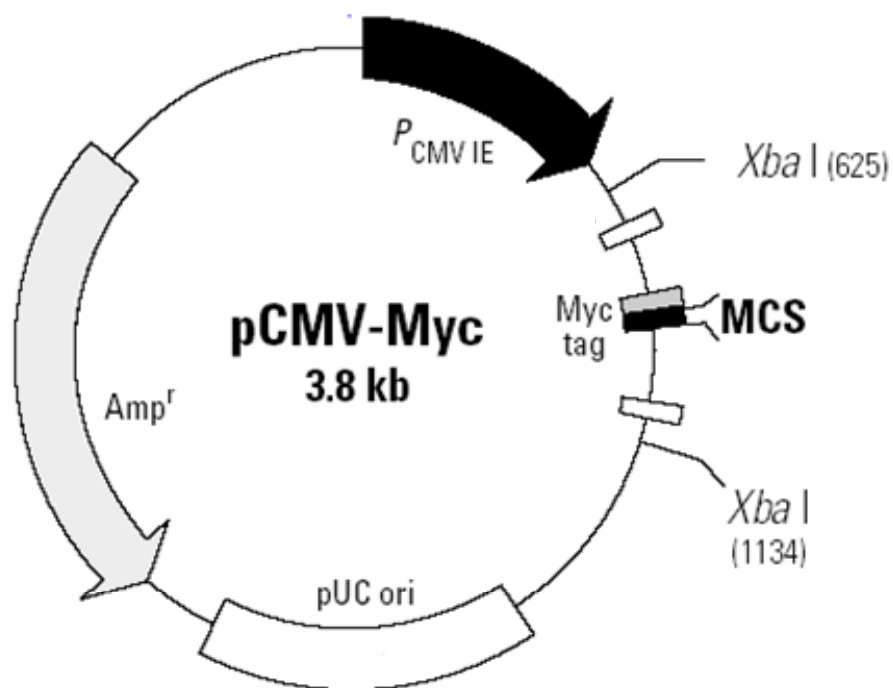
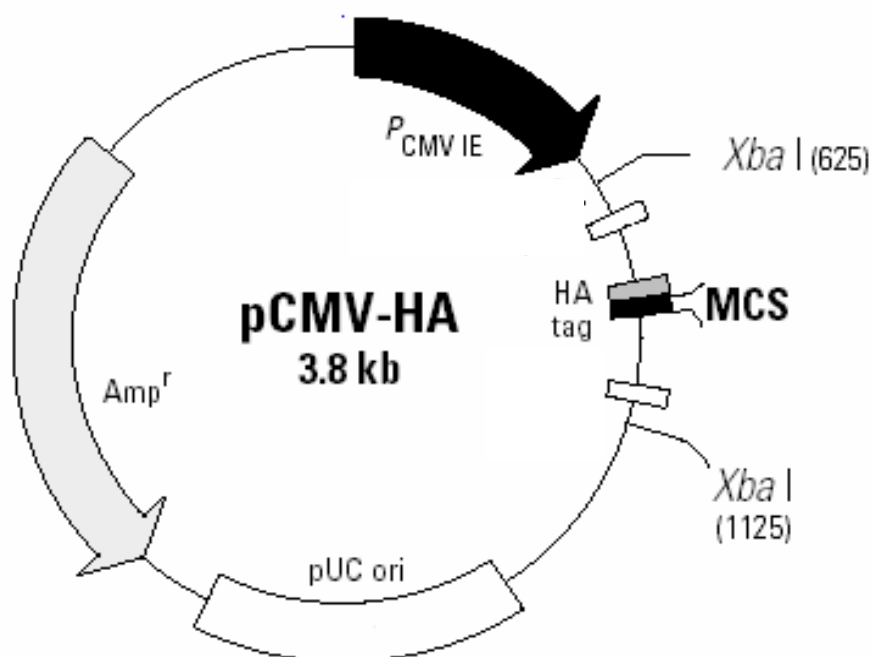
Programm für Mycoplasmentest-PCR

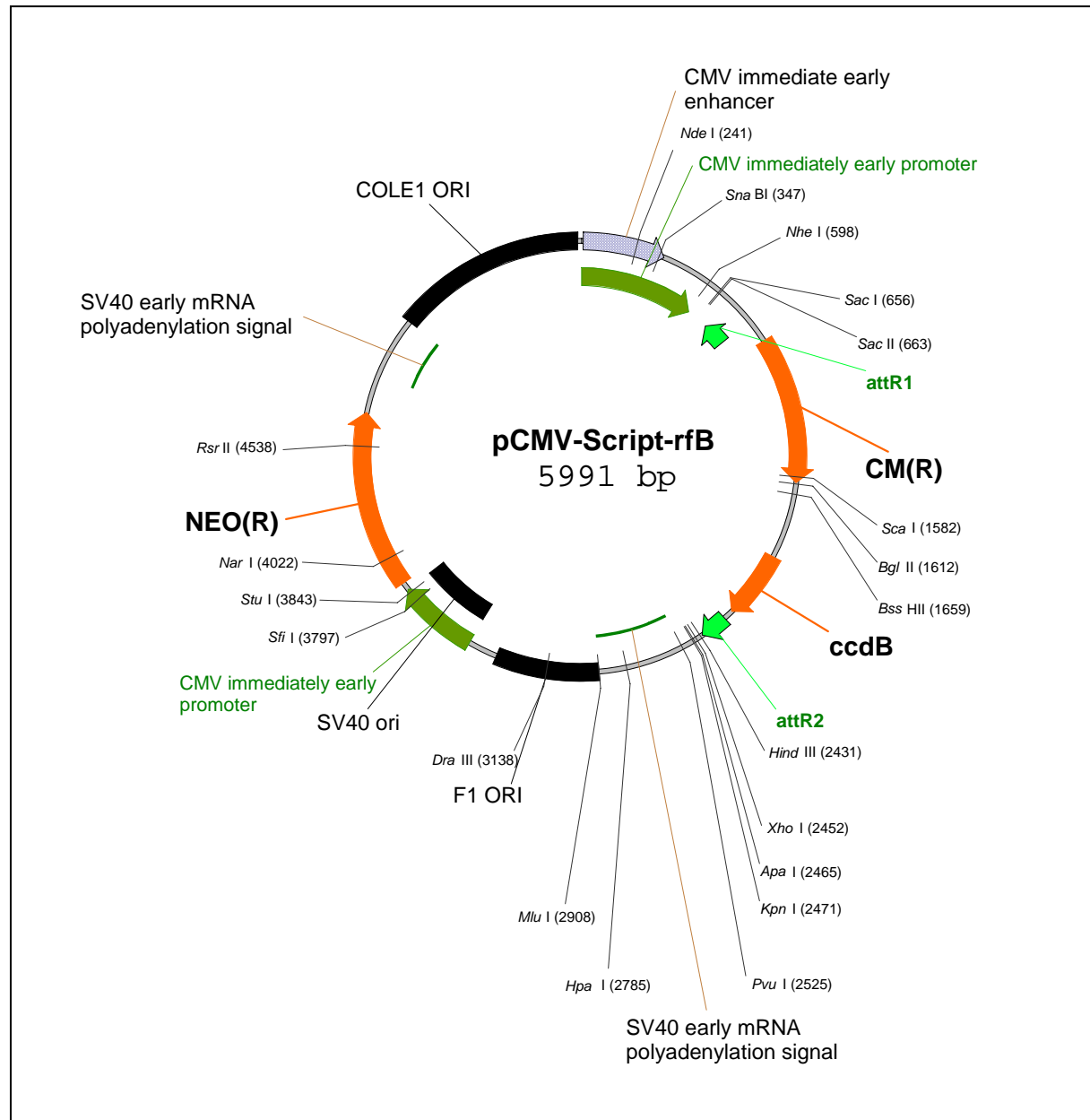
10.2 Vektor-Karten











Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig
und unter Verwendung der angegebenen Mittel
angefertigt zu haben.
